

Université de Montréal

**Optophysiology SERS : Analyse *in vitro* d'environnement
cellulaire en Raman exalté par les surfaces**

par Félix Lussier

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en chimie

Mars 2019

© Félix Lussier, 2019

Résumé

Afin d'assurer la communication et la régulation de leur métabolisme, les cellules vivantes sécrètent une panoplie de petites et grandes molécules agissant comme messagers chimiques. Ces messagers sont généralement libérés dans l'environnement extracellulaire et diffusent jusqu'à l'atteinte d'une cible moléculaire bien précise. Cet événement de reconnaissance biologique induit une cascade de réactions biochimiques qui sont le fondement des fonctions biologiques des cellules. Un dysfonctionnement associé à la sécrétion de messagers chimiques est associé à plusieurs conséquences cliniques. Par exemple, un changement de composition des neurotransmetteurs lors de la libération synaptique dans le cerveau est associé à la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la dépression, les dépendances et la schizophrénie. L'analyse des messagers chimiques est donc d'une grande importance dans le domaine clinique. Néanmoins, les méthodes analytiques contemporaines ne sont pas aptes à mesurer les changements rapides et hétérogènes des messagers chimiques lors d'événements de sécrétion cellulaire. De nouvelles techniques permettant une analyse hautement sensible de plusieurs messagers chimiques simultanément et de manière localisée sont nécessaires. Les matériaux plasmoniques permettent l'utilisation de spectroscopies exaltée par les métaux comme la diffusion Raman exaltée par les effets de surfaces (SERS). Grâce à la spécificité moléculaire du SERS et à sa haute sensibilité, pouvant atteindre la détection d'une seule molécule, les capteurs SERS offrent divers avantages permettant le développement de nouvelles technologies dédiées aux mesures des sécrétions cellulaires.

L'objectif principal de la thèse est la mise au point de nouveaux capteurs SERS permettant l'analyse des sécrétions cellulaires avec une haute sensibilité et une haute sélectivité.

Pour y arriver, des nanoparticules d'or furent adsorbées sur des capillaires de verres nanométriques de type *patch clamp*. L'immobilisation des nanoparticules sur ces *patch clamp* génère un nanocapteur plasmonique pouvant être positionné dans l'espace, tout en conservant un état d'agrégation constant, facteur clé en SERS. Ces nanocapteurs furent donc positionnés près de cellules *in vitro*, puis des spectres SERS furent acquis dans le temps. Afin d'analyser cette réponse optique complexe, de nouvelles méthodes chimiométriques ont été développées.

Comme première approche, un code-barres unique fut extrait à partir de chaque parton vibrationnel expérimental mesuré par SERS dans le temps, puis comparés à ceux d'une librairie extraient à partir de standards. Cette comparaison permet : (1) l'identification de la molécule selon son code-barres et (2) une analyse semi-quantitative en dénombrant le nombre de fois qu'un code-barres fut identifié sur une période de temps précise. Cette méthode chimiométrique, définie comme l'optophysioSERS, fut employée pour sonder les métabolites extracellulaires sécrétés par des cellules MDCKII au niveau basal et post-stimulation. Par sa nouveauté, l'optophysioSERS requiert une optimisation des paramètres d'analyse, limitant sa capacité de multiplexage et son adaptation pour la détection de nouvelles cibles moléculaires.

Afin d'en améliorer la sensibilité et la sélectivité, un nouvel algorithme d'évaluation des codes-barres fut implémenté à l'optophysioSERS. Ce nouvel algorithme fut employé pour sonder les neurotransmetteurs sécrétés par des neurones dopaminergiques originaires du mésencéphale de souris. De plus, afin de visualiser les neurones et positionner correctement les nanocapteurs près des varicosités axonales, sites de libération majeure des neurotransmetteurs, un microscope combiné permettant l'imagerie de fluorescence et la spectroscopie Raman fut construit. À l'aide de ces outils, il fut possible de mesurer les changements relatifs de concentration *in vitro* de cinq neurotransmetteurs dans des conditions basales et durant plusieurs cycles de stimulation.

Les performances analytiques de l'optophysiology SERS dépendent, majoritairement, des codes-barres utilisés pour l'analyse, nécessitant donc une optimisation laborieuse de ces derniers. Cette optimisation constitue un obstacle majeur pour la translation de l'optophysiology SERS vers le domaine clinique. Pour pallier à ce problème, plusieurs codes barre furent attribués par molécule et analyser, de manière analogue à de la reconnaissance faciale, par un réseau neuronal artificiel. L'optophysiology SERS couplée à de l'intelligence artificielle a permis la détection de plus de sept métabolites extracellulaires associés au métabolisme de carbone, de l'azote et de l'énergie dans des cellules cancéreuses et contrôles.

Les expériences présentées dans la thèse montrent le potentiel d'application de l'optophysiology SERS pour la détection de métabolites sécrétés par des neurones, ou d'autres types de cellules présentant divers phénotypes, afin d'en étudier les fonctions biologiques normales ou celles associées à une pathologie. Ces nouvelles technologies mèneront certainement à des percées importantes dans différents domaines cliniques et scientifiques.

Mots-clés : Métabolisme cellulaire, Spectroscopie Raman exaltée par les effets de surface, Intelligence artificielle, Nanocapteur, Neurotransmetteurs, Cellules cancéreuses, Neurones, Optophysiology SERS

Abstract

To insure the signaling and regulation of their metabolism, living cells secrete a plethora of small and large molecule referred as chemical messengers. These messengers are generally secreted into the extracellular space, and diffuse until they reached a specific molecular target. The resulting biological recognition event between a chemical messenger and its dedicated molecular receptor induces a cascade of biochemical reactions, corresponding to the fundamental function of biological cells. However, a dysfunction associated to the secretion of these chemical messengers is linked to multiple clinical diseases. As an example, a change in the composition of neurotransmitters released during synaptic transmission in the brain is associated to Alzheimer disease, Parkinson disease, depression, addiction and schizophrenia. Thus, the analysis of the chemical messenger is of great clinical interest. However, modern analytical methods are ill suited to capture the fast and heterogeneous changes in chemical messengers during secretion events. New technologies allowing a sensitive and simultaneous monitoring of chemical messengers in a local and non-destructive way is needed.

Plasmonic materials enable surface enhanced spectroscopies such as surface enhanced Raman scattering (SERS). With the molecular selectivity of SERS, and its high sensitivity, capable of detecting a single molecule, SERS sensors offer multiple advantages allowing the development of new technologies adapted for monitoring cellular secretion.

The main objective of the thesis is the development of a novel SERS sensor capable of monitoring cellular secretion with both high sensitivity and selectivity. To achieve this goal, gold nanoparticles were electrostatically adsorbed onto a nanometric sized *patch clamp* glass capillary. The immobilization of the nanoparticles led to the generation of plasmonic nanosensors, which can be positioned in space while keeping a constant aggregation state, a key

parameter in SERS. These nanosensors were then positioned near cells *in vitro* and SERS spectra were acquired in time. In order to analyze the complex optical response, novel chemometric approaches were developed.

As a starting point, a unique barcode was extracted from each experimental SERS spectrum detected in time, and then compared with a spectral database of SERS barcode extracted from various standards. This approach enabled (1) identification of the molecule according to the barcode, and (2) a semi-quantitative analysis by counting the number of times the barcode, for each standard, was detected within a defined timescale. This chemometric method, referred as SERS optophysiology, was applied to monitor abundant metabolites in the extracellular environment near MDCKII cells in both basal and stimulated conditions. As this is a new method, SERS optophysiology required optimization of its hyper-parameters prior to the analysis, thus limiting its multiplex capability and adaptation to detect novel molecular targets.

To improve the analytic performance of SERS optophysiology, we implemented a new algorithm to evaluate the barcodes. This new algorithm was applied to monitor neurotransmitters secreted by dopaminergic neurons from mice mesencephalon. Also, to visualize the neurons and correctly positioned the nanosensor near axonal varicosities, a hyphenated fluorescence-Raman microscope was built. With these tools, we successfully monitored the relative changes in concentration of five neurotransmitters in basal condition and throughout multiple stimulation cycles.

Although improved, the analytical performances of SERS optophysiology depend mostly on the barcode data processing which thus required an extensive optimization to achieve good selectivity and sensitivity, limiting the translation of these technologies to other users. To

overcome this limitation, multiple barcodes were thus associated to a single standard and analyzed with an artificial neural network, analogous to facial recognition. Machine learning driven SERS optophysiology enabled the detection of more than seven metabolites associated to the metabolism of carbon, nitrogen and energy of healthy and cancerous cell lines.

The experiments presented in the thesis show the application potential of SERS optophysiology for the detection of secreted metabolites by neurons, or other type of cells exhibiting different phenotype, in order to investigate biological functions in a normal or disease state. These novel technologies thus hold a promising potential for significant discoveries in many fields of medicine and general science.

Keywords : Cellular metabolism, Surface enhanced Raman spectroscopy, Artificial intelligence, Nanosensor, Neurotransmitters, Cancer cells, Neurons, SERS optophysiology

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations.....	xviii
Remerciements.....	xxv
1. Introduction.....	1
1.1. Signalisation et métabolisme cellulaire	1
1.2. Méthodes analytiques contemporaines	4
1.3. Matériaux plasmoniques	7
1.4. Spectroscopies exaltées par les métaux	10
1.5. Méthodes d'analyse spectrale	13
1.6. Intelligence artificielle	15
1.6.1. Neurone artificiel	15
1.6.2. Réseau neuronal artificiel	16
1.6.3. Descente du gradient.....	18
1.6.4. Rétro-propagation	20
1.6.5. Réseau neuronal de convolution	21
1.6.6. Couche de correction	23
1.6.7. Couche de sous-échantillonnage.....	24
1.6.8. Mécanisme de régularisation des réseaux neuronaux.....	25
1.7. Optophysiology SERS	28
1.8. Objectifs de la thèse	33
1.9. Contenu de la thèse	35
1.10. Références.....	37
2. Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events.	53
2.1. Abstract.....	53
2.2. Introduction.....	54

2.3.	Acknowledgements.....	66
2.4.	References.....	66
2.5.	Supporting information.....	71
2.5.1.	Experimental details.....	71
2.5.1.1.	Materials:	71
2.5.1.2.	Instrumentation	71
2.5.1.3.	Nanoparticles synthesis.....	72
2.5.1.4.	Nanosensor fabrication and functionalization:	72
2.5.1.5.	Cell growth procedure:	73
2.5.1.6.	Cell secretion monitoring by dynamic SERS nanosensing:	73
2.5.2.	Supplemental information for Results and Discussion.....	73
2.5.2.1.	General conception of the plasmonic nanopipette:	73
2.5.2.2.	Data processing.....	74
2.5.2.3.	Limited selectivity for glucose and urea	76
2.5.3.	References:.....	77
3.	Dynamic SERS Nanosensor for Neurotransmitter Sensing Near Neurons	85
3.1.	Abstract.....	85
3.2.	Introduction.....	86
3.3.	Results and discussion	89
3.3.1.	Chemometric data processing.....	89
3.3.2.	Combined Raman-fluorescence microscopy and fluidic set up.....	97
3.3.3.	Immunocytochemistry and spatially resolved fluorescence imaging.	99
3.3.4.	Neurotransmitter monitoring by D-SERS optophysiology:.....	102
3.4.	Conclusion	107
3.5.	Experimental details.....	108
3.5.1.	Nanoparticle synthesis	108
3.5.2.	Nanosensor fabrication and functionalization	108
3.5.3.	Animals.....	109
3.5.4.	Primary Neuronal Cultures	109
3.5.5.	Immunostaining and image acquisitions.....	109
3.5.6.	SERS measurements	110

3.6.	Acknowledgements.....	111
3.7.	References.....	111
4.	Machine Learning Driven SERS Optophysiology Reveals Multiplexed Metabolite Gradients Near Cells.....	117
4.1.	Abstract.....	117
4.2.	Introduction.....	118
4.3.	Results and discussion	119
4.4.	Conclusions.....	129
4.5.	Author contributions	130
4.6.	Acknowledgements.....	130
4.7.	Materials and Methods.....	131
4.7.1.	Nanoparticles synthesis:.....	131
4.7.2.	SERS nanosensor fabrication:.....	131
4.7.3.	Cell growth procedure:	132
4.7.4.	SERS optophysiology:	132
4.7.5.	Data processing using convolutional neural network:	133
4.8.	References.....	134
4.9.	Supporting information.....	139
4.9.1.	Current limitation of single barcode SERS optophysiology:.....	139
4.9.1.1.	Discussion on the previous data processing algorithm:	139
4.9.1.2.	Advantage of SERS optophysiology	140
4.9.3	References:.....	143
5.	Conclusion	144
5.1.	Conclusions générales.....	144
5.1.1.	L’optophysiology SERS	144
5.2.	Perspectives.....	146
5.2.1.	Optophysiology SERS quantitative	146
5.2.1.1.	Auto-assemblage préprogrammé	146
5.2.1.2.	SERS sans marquage quantitatif.....	148
5.2.2.	Validation de l’optophysiology.....	150
5.2.2.1.	Validation par spectrométrie de masse	150

5.2.3.	Couplage à l'optophysiology	151
5.2.4.	Limitation des méthodes d'apprentissages supervisées	152
5.3.	Références	153

Liste des tableaux

Table I. Optimized chemometric parameters for sensitive and selective sorting of different neurotransmitters.....	92
--	----

Liste des figures

Figure 1.1	Schématisation de mécanisme de signalisation intercellulaire par exocytose de messagers chimiques.....	1
Figure 1.2	Stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β	3
Figure 1.3	Excitation des plasmons de surface par la lumière.	8
Figure 1.4	Excitation directe du LSPR par la lumière.	9
Figure 1.5	Densité optique $(E/E_0)^2$ produite par une nanosphère d'or de 60 nm excitée à une longueur d'onde de 550 nm (gauche) et une nanoframboise d'or de 90 nm excitée à une longueur d'onde de 590 nm (droite).....	11
Figure 1.6	Amplification du champ électrique local entre les deux pointes d'un dimer composé de nanotriangles d'argent excité à la longueur d'extinction maximale de 932 nm. ..	11
Figure 1.7	Catégorisation de différentes bactéries du groupe <i>Cereus</i> (gauche) par analyse de composantes principales (PCA) de différents spectres SERS	14
Figure 1.8	Comparaison entre un neurone biologique et artificiel et schématisation mathématique d'un neurone artificiel (perceptron).	16
Figure 1.9	Représentation d'un réseau neuronal multicouche composé de la couche de neurones d'entrées, de deux couches cachées et d'une couche de sortie composée d'une seule valeur qui sera utilisée comme prédiction.	17
Figure 1.10	Représentation de la surface vallonnée de la fonction de perte $\mathcal{L}(\theta)$ dans l'espace de haute dimension des poids.	19
Figure 1.11	(A) Présentation d'un réseau à propagation vers l'avant (<i>feed forward</i>), où à chaque couche, les entrées x_i sont pondérées à l'aide de poids w_{ij} et sommées. Ensuite, une fonction non linéaire f est appliquée à z_j afin d'obtenir la sortie y_j des différents neurones des couches. Pour ce type de réseau neuronal, l'information ne se déplace que dans une seule direction, vers un niveau d'abstraction toujours plus important. (B) Présentation des équations permettant la rétro-propagation.....	21
Figure 1.12	(A) Représentation biologique de neurones dans le cortex visuel où la transmission d'information s'effectue entre différents groupes discrets de neurones vers des groupes de plus petites tailles entre chaque connexion, justifiant la transmission d'information hautement pertinente. (B) Représentation d'une couche de convolution, où un filtre de poids est	

appliqué à une matrice d'entrées. Le filtre est partagé permis toutes les entrées de la matrice. Ce dernier est ensuite déplacé d'un pas p_x et p_y (e.g. 1). Les entrées sont multipliées par le poids correspondant et sommées afin de générer leur sortie respective. L'application d'une convolution induit une réduction de la taille de la matrice d'entrées. Par souci de clarté, la matrice de biais est omise (C) Schématisation de l'utilisation de plusieurs filtres de poids différents (e.g. 3) par une couche de convolution..... 22

Figure 1.13 Représentation des différentes fonctions d'activation employées par les couches de correction d'un réseau de convolution. 24

Figure 1.14 Opération de sous-échantillonnage par *max pooling* servant à déterminer la valeur maximale au sein des pixels composant un filtre de taille défini 24

Figure 1.15 Courbes de pertes sur les données d'entraînement et d'évaluation démontrant le surapprentissage du réseau lors de l'entraînement..... 25

Figure 1.16 (A) Réseau neuronal standard, où aucun mécanisme de régularisation n'est appliqué. (B) Réseau neuronal où le *dropout* est appliqué comme mécanisme de régularisation lors de l'apprentissage servant à minimiser le surapprentissage. 26

Figure 1.17 Architecture du réseau neuronal de convolution, basé sur l'architecture LeNet-5¹²⁹, adaptée à la reconnaissance de spectre Raman de messagers chimiques 27

Figure 1.18 Présentation générale du traitement chimiométrique effectué dans l'optophysiology SERS..... 30

Figure 1.19 Comparaison de la réponse instrumentale mesurée typique en optophysiology SERS et en électrophysiology..... 31

Figure 1.20 Performance SERS de nanofibres décorées de nanosphères d'or adsorbées sur un copolymère bloc..... 32

Figure 1.21 Schéma montrant les diverses relations entre les objectifs de la thèse visant au développement de l'optophysiology SERS, nouvelle technologie permettant l'analyse de l'environnement extracellulaire. 34

Figure 2.1 (Left) Representation of the concept of a SERS nanosensor to monitor cellular secretion. (Right) SEM image of a typical SERS nanosensor on a pulled glass capillary modified with gold nanoraspberries. 56

Figure 2.2 (Left) SERS spectra of pyruvate, L-lactate, ATP, D-glucose and urea generated by the first eigenvalue of principal component analysis (PCA). These experimental spectra were

recorded for each molecule in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at a concentration of 1 μ M with the SERS nanosensor. These spectra were used as references to construct our SERS spectra database. From these standards, a barcode was generated from the 10 peaks with the highest intensity. (Right) Evaluation of the selectivity of the chemometric algorithm of the metabolites studied here. 58

Figure 2.3 (Top) Average corrected number of event counted for different biomolecules: Pyruvate, lactate, ATP and urea in five different and independent cells samples – nanosensor couple. The SERS nanosensors were located 30 μ m above the cells surface and kept at a constant height during the duration of the experiment. Measurements were carried in sterile Opti-MEM buffer. The number of events for the different section of the assay were all baseline corrected with the response of the nanosensor in steril Opti-MEM buffer in absence of cells. Spiked Opti-MEM and spiked saponin correspond respectively to the section when Opti-MEM and saponin were injected into the medium. (Bottom) A single temporal detection of urea, ATP, pyruvate and lactate with dynamic SERS on the nanosensor. 62

Figure 2.4 Relative number of events (%) for lactate (grey squares) and pyruvate (black triangles) near MDCKII cells measured at different nanosensor-cell distances in Opti-MEM in absence of saponin. 65

Figure S2.1 Characterisation of the SERS nanosensors functionalized with nanoraspberries. (a) SEM images of a typical pulled capillary covered with gold nanoraspberries (top left) and high magnification (top right). 79

Figure S2.2 Surface density of gold nanoraspberries (in nanoparticles per μ m²) on an APTES functionalized pulled capillary for (left) different exposition time to a 0.3% APTES solution in anhydrous ethanol with a constant exposition time the colloidal suspension of 30 min and for (right) different exposition times to the colloidal suspension with an optimal APTES exposition time of 30 minutes. 80

Figure S2.3 SERS intensity of the gold nanoraspberries for different exposition time to the colloidal suspension. 80

Figure S2.4 Semi log curve corresponding to dynamic light scattering (DLS) measurements of gold nanoraspberries in water at room temperature. 81

Figure S2.5	Representation of the barcodes generated by the chemometric algorithm for lactate, ATP, urea, and pyruvate. The bottom graph showed the overlaid representation of the barcodes for the four different molecules.	82
Figure S2.6	Number of events for binary mixtures according to the SERS identification and counting by the SERS nanosensor in a 10 μ M solution of each of the corresponding biomolecules.	83
Figure S2.7	Bi-analyte SERS experiment containing 1 μ M equimolar solution of pyruvate and lactate using a plasmonic nanopipette.	83
Figure S2.8	Evaluation of the Opti-MEM baseline and saponin by D-SERS. Measurements were performed on 4 different plasmonic nanopipettes.	84
Figure 3.1	Scanning electron microscopy (SEM) images of a typical D-SERS nanosensor coated with 70 nm gold nanoraspberries.	91
Figure 3.2	SERS spectra of dopamine (DA), glutamate (glu), adenosine triphosphate (ATP), acetylcholine (ACh) and γ -aminobutyric acid (GABA) and their corresponding barcode.	93
Figure 3.3	Comparison of the cross-selectivity assay of the data processing algorithm of different solutions containing a single standard.	95
Figure 3.4	Number of events for an equimolar binary mixture of DA and ATP in a solution containing 1 mg/mL of each neurotransmitter evaluated by using variable numbers of bands for every neurotransmitter.	96
Figure 3.5	Scheme of the combined Raman-Fluorescence microscope developed on a alpha300 from Witec (Ulm, Germany).	98
Figure 3.6	Immunocytochemistry fluorescence images of dopaminergic neurons obtained with a TE 200 fluorescence microscope from Nikon (Tokyo, Japan).	100
Figure 3.7	Spatially resolved fluorescence imaging with a combined Raman-fluorescence microscope.	101
Figure 3.8	Frequency of D-SERS events of different neurotransmitters near primary astrocytes (glial cells) and dopaminergic neurons.	103
Figure 3.9	Series of 10 consecutively acquired D-SERS spectra during depolarisation experiments showing the raw spectral data recorded in close proximity to neurons in physiological experiments.	104

Figure 3.10 D-SERS optophysiology curves for DA, glu, ATP, ACh and GABA detected near dopaminergic neurons. 106

Figure 4.1 (A) General scheme of a convolutional neural network (CNN). Pre-processed training dataset were fed into the untrained neural network (left). Each data was labelled to their corresponding metabolites. Weights, represented as grey spheres, were then optimized (schematized as variable sizes) in order to minimize the error of the output of the neural network. Following the optimization of the model for those specific metabolites, unknown data, acquired and pre-processed in the exact same way, were fed into the trained model (right). The output results, define as a prediction, returned a value of 1 for the corresponding metabolites having the highest classification probability. SERS spectra were all sorted, and counted based on this classification process. (B) Cross-entropy loss and (C) accuracy throughout training of the CNN. Mean and range are presented of 10 randomized training and test datasets. Each training was performed on a training dataset composed of at least 1000 spectra per metabolite. The cross-entropy loss corresponded to the mean square error between the prediction, and the true expected value. (D) 10 k-fold confusion matrix, in percentage (%), of randomized validation dataset using a trained CNN for vibrational recognition of pyruvate, lactate, ATP, ADP, glucose, glutamine and urea. The cellular medium (CO₂ independent medium) was included in order to categorize positive event associated to the medium. The normalized mean number of spectra is presented. The mean value was evaluated by training the CNN ten times while shuffling the SERS spectra used for both training, and validation between training (10-k fold). The associated s.e.m. is respectively presented in (E). The validation dataset included an average number of 80 spectra per metabolite.121

Figure 4.2 Representation of the SERS optophysiology distance curves experiments.... 123

Figure 4.3 Typical SERS spectra acquired in time at different cell-nanosensor distances for HeLa cells. 124

Figure 4.4 Simplified representation of metabolic pathways involved in typical living cells such as glycolysis and the tricarboxylic acid cycle (TCA) allowing the biosynthesis of the energy-associated metabolite ATP. 125

Figure 4.5 Multiplex metabolites sensing near living cells..... 127

Figure S4.1	(A) SEM image of the gold nanoraspberry-coated nanosensor for SERS measurements near cells a magnification of 2,000X. (B) SEM image at higher magnification (10,000X) of the same nanosensor.....	140
Figure S4.2	Distance curves of extracellular pyruvate near REF52 (left), HUVEC (center) and HeLa (right).....	141
Figure S4.3	Metabolites counts near (distance of 0 μm) and far away (distance of 2000 μm) from the REF52, HUVEC and HeLa cells in CO_2 independent medium at 37 $^\circ\text{C}$	142
Figure S4.4	Extracellular ADP counts near ($x = 0$) REF52, HUVEC and HeLa cells in CO_2 independent medium at 37 $^\circ\text{C}$	142
Figure S4.5	(Top) lactate: glucose ratio and (Bottom) ATP: ADP ratio at different cell to nanosensors distance near HeLa, HUVEC, and REF52 cells.	143
Figure 5.1	Présentation d'un réseau neuronal permettant la classification et la quantification.	149
Figure 5.2	Validation de l'optophysiology SERS par analyse comparative avec la spectrométrie de masse (MS).....	151

Liste des abréviations

•OH	Radical hydroxyle
5-HT	5-hydroxytryptamine, sérotonine (<i>Serotonin</i>)
<i>A</i>	absorbance
<i>a</i>	Taille de la nanoparticule (<i>nanoparticle size</i>)
ABC	Transporteurs ATP binding cassette (<i>ATP binding cassette transporter</i>)
Acetyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ACh	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	Microscopie de forces atomiques (<i>Atomic force microscopy</i>)
airPLS	Adaptation itérative des moindres carrées pondérés pénalisé (<i>Adaptive iteratively reweighted penalized least squares</i>)
AMP	Adénosine monophosphate
ANN	Réseau neuronal artificiel (<i>Artificial neural network</i>)
ANOVA	Analyse de la variance (<i>Analysis of variance</i>)
APTES	3-aminopropyl-triétoxysilane ((<i>3-aminopropyl</i>) triethoxysilane)
AST	Astrocyte
ATP	Adénosine triphosphate
AuNPs	Nanoparticules d'or (<i>Gold nanoparticles</i>)
<i>b</i>	Biais
BCP	Copolymère bloc (<i>Bloc-co-polymer</i>)

BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovin Serum Albumine</i>)
CARS	diffusion Raman anti-Stokes cohérente (<i>Coherent anti-Stokes Raman scattering</i>)
CNN	Réseau neuronal de convolution (<i>Convolutional neural network</i>)
CNS	Système nerveu centrale (<i>Central nervous system</i>)
DA	Dopamine
DLS	Diffusion dynamic de la lumière (<i>Dynamic light scattering</i>)
DNN	Réseau neuronale profond (<i>Deep neural network</i>)
D-SERS	Spectroscopie Raman exaltée par les surfaces dynamique (<i>Dynamic surface enhanced Raman spcattering</i>)
E	Champ électrique (<i>electrical field</i>)
E_0	Champ électrique standard/initial (<i>Standard/initial electrical field</i>)
EC	Électrophorèse capillaire (<i>Capillary electrophoresis</i>)
EC-SERS	SERS-électrochimique (<i>Electrochemical-SERS</i>)
ELU	Unité exponentiel linéaire (<i>Exponential linear unit</i>)
ESI	Nébulisation électrostatique (<i>Electrospray ionisation</i>)
ETC	Chaîne de transport d'électron (<i>Electron transport chain</i>)
FBS	Sérum de veau foetal (<i>Foetal bovin serum</i>)
FSCV	Voltampérométrie cyclique à balayage rapide (<i>Fast-scan cyclic voltammetry</i>)
GABA	Acide γ -Aminobutyrique (<i>γ-Aminobutyric acid</i>)
GC	Cellule granulaire
GDH	Glutamate déshydrogénase (glutamate dehydrogenase)

GFP	Protéine fluorescente verte (<i>Green fluorescent protein</i>)
GLS	Glutaminase
GLS2	Glutaminase 2
Glu	Glutamate
<i>Glut2</i>	Transporteur de glucose (<i>glucose transporter</i>)
GNR	Nanobatonnets d'or (<i>Gold nanorods</i>)
GP	Processus Gaussien (<i>Gaussian process</i>)
GTP	Guanosine triphosphate
HCA	Regroupements hiérarchiques (<i>Hierarchical clustering analysis</i>)
HeLa	Cellule cancéreuse HeLa (<i>HeLa cancer cell</i>)
HeNe	Helium-Neon
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (<i>4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>)
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>)
IR	Infrarouge (<i>infrared</i>)
K^{+} stim.	Stimulation au potassium 40 mM (<i>stimulation with 40 mM potassium</i>)
K_{ATP}	Canal potassique sensible à l'ATP (<i>ATP-sensitive potassium channel</i>)
k_{hv}	Vecteur d'onde de la lumière (<i>wave vector of light</i>)
k_{sp}	Vecteur d'onde du plasmon de surface (<i>Wave vector of the surface plasmon</i>)
LC	Chromatographie liquide (<i>Liquid Chromatography</i>)
LDA	Analyse linéaire discriminantes (<i>Linear discriminant analysis</i>)

LDH	L-lactate déshydrogénase (<i>L-lactate dehydrogenase</i>)
Leaky ReLU	Unité de rectification linéaire paramétrique (<i>Leaky ReLu</i>)
LSP	Plasmon de surface localisé (<i>Localized surface plasmon</i>)
LSPR	Résonance de plasmon de surface localisée (<i>Localized surface plasmon resonance</i>)
MB	Bleu de méthylène (<i>Methylene blue</i>)
MDCKII	Cellules rénales canines Madin-Darby (<i>Madin-Darby canine kidney epithelial cell</i>)
MEF	Fluorescence exaltée par les métaux (<i>Metal enhanced Fluorescence</i>)
MEM	Milieu minimal essentiel de Eagle (<i>Eagle's minimum essential medium</i>)
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass spectrometry</i>)
NA	Ouverture numérique (<i>Numerical aperture</i>)
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
OATR	Un-contre le reste (<i>One-Against-the rest</i>)
OXPHOS	Phosphorylation oxydative (<i>Oxydative phosphorylation</i>)
PBS	Tampon phosphate saline (<i>Phosphate saline buffer</i>)
PC	Composantes principales (<i>Principal component</i>)
PCA	Analyse de composantes principales (<i>Principal component analysis</i>)
PDF	Fonction de densité de probabilité (<i>Probability density function</i>)
PDH	Pyruvate déshydrogénase (<i>pyruvate dehydrogenase</i>)
PLS	Moindres carrées (<i>Partial least square</i>)
PS-b-P4VP	Polystyrène- <i>bloc</i> -poly(4-vinylpyridine)
REF52	Fibroblaste REF52 (<i>Fibroblast REF52</i>)

ReLU	Unité de rectification linéaire (<i>Rectified linear unit</i>)
ROO•	Radical peroxyde
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (<i>Reactive oxygen species</i>)
SEM	Microscopie électronique à balayage (<i>Scanning electronic microscopy</i>)
SERS	Diffusion Raman exaltée par les effets de surface (<i>Surface enhanced Raman scattering</i>)
SG	Algorithme de Savitzky-Golay
SGD	Descente stochastique du gradient (<i>Stochastic gradient descente</i>)
SIRT4	Protéine Sirtuine 4 (<i>Sirtuin 4 protein</i>)
SM	Molécule unique (<i>Single molecule</i>)
SNR	Ratio signal-sur-bruit (<i>Signal-to-noise ratio</i>)
SPM	Microscopie à balayage de sonde (<i>Scanning probe microscopy</i>)
SPP	Plasmon de surface propagatif (<i>Propagative surface plasmon</i>)
SPR	Résonance de Plasmons de surface (<i>Plasmon surface resonance</i>)
SVM	Machines à vecteurs de supports (<i>Support vector machine</i>)
SVR	Régression par machine à vecteurs de support (<i>Support vector regression</i>)
TCA	Cycle de Krebs (<i>Tricarboxylic acid cycle</i>)
TEM	Microscopie électronique à transmission (<i>Transmission electronic microscopy</i>)
TERS	Diffusion Raman exaltée par effet de pointe (<i>Tip enhanced Raman scattering</i>)
UV-Vis	Spectroscopie UV-visible (<i>UV-Vis Spectroscopy</i>)
VC	Voltampérométrie cyclique (<i>Cyclic voltammetry</i>)

VGLUT	Transporteur vésiculaire de glutamate (<i>Vesicular glutamate transporter</i>)
W_i	Poids (<i>weight</i>)
ε_i	Partie imaginaire de la constante diélectrique (<i>imaginary part of the dielectric constante</i>)
ε_{out}	Constante diélectrique de l'environnement (<i>dielectric constant of the surrounding medium</i>)
ε_r	Partie réelle de la constante diélectrique (<i>real part of the dielectrique constante</i>)
X	Facteur d'asymétrie (<i>asymmetric factor</i>)
ω	Fréquence angulaire (<i>angular frequency</i>)

À ma mère Lynda, qui a su nourrir ma passion jusqu'à la fin

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le professeur Jean-François Masson qui, lors de tout mon cheminement, a su me supporter au moment où j'en avais le plus besoin en plus de m'offrir une liberté de recherche complète lors de mes travaux de doctorat. Pour moi, mes années de recherches passées dans ton groupe peuvent être comparées à un enfant que l'on amène au parc pour la première fois chaque jour. Toujours quelque chose de nouveau à découvrir, à explorer et à essayer. Tu as su nourrir ma curiosité. Cette liberté m'a sans aucun doute permis de m'épanouir pleinement en tant que chercheur et faire preuve d'adversité lorsque les choses ne fonctionnent pas comme elles devraient (ou plutôt, voudraient). Tu as aussi su être un confident et tu m'as supporté dans certains moments difficiles ces dernières années et je t'en remercie. J'aimerais aussi te remercier d'avoir supporté/enduré tous mes caprices de jeune chercheur naïf, voulant travailler sur tout en même temps en plus de saisir toutes les opportunités de recherche à l'étranger possible, parfois simultanément. Ce n'est pas parce que je trouvais la recherche plate à Montréal, mais simplement qu'il y a trop de domaines et sujets de recherche intéressants. Je crois que c'est mon côté « électron libre » (blague de chimistes, et oui, maintenant que je suis père, je peux me permettre de faire des jokes de papa ouvertement), qui m'a attiré vers le projet d'envergure pluridisciplinaire que tu m'avais proposé cinq ans plus tôt. Bref, merci, je n'aurais pas pu rêver d'un meilleur père académique et j'espère faire partie, peut-être un jour, de l'un de tes collègues.

J'aimerais remercier les membres de mon groupe de recherche, passés et actuels, qui ont participé activement et passivement à mon développement en tant que chercheur. Julien, Alexandra, Hugo-Pierre, Ludovic et Maxime, vous n'êtes probablement pas au courant, mais vous avez tous eu une importante influence sur moi (positive, bien sûr) vous m'avez appris la rigueur scientifique et surtout le sens critique. J'aimerais remercier Thibault et Kristy, deux stagiaires postdoctoraux incroyables. *Wee girl, I had so much fun while you were here and when we were in Hawaii. Those late-night beers, where we talked about wee Tam and where you teach me some Scottish slang words such as (funny fanny) were unforgettable. One for the ditch!* J'aimerais aussi remercier tous les autres membres: Simon F., Simon L., Geneviève, Trevor, Natalia, Jérémie, Benjamin, Philippe, Greg, Vincent, Marie-Pier et Hu. Merci à tous pour ces

années de discussions, de rires et de support. J'aimerais remercier mes stagiaires, Jean-Antoine et Johannes, de m'avoir supporté, moi et mes gags discutables et mon énergie parfois difficile en contenir. *Johannes, I'm looking forward to see you gain once I'm in Germany. Unfortunately for you, I'm still gonna call you dumba** , Du bist mein Prinz der mich auf fängt wenn ich falle, du zauberst mir immer ein lächeln in Gesicht....(You know what I mean haHAHA!)*.

J'aimerais aussi remercier mes collaborateurs du département de neurosciences, le professeur Louis-Éric Trudeau, Marie-Josée et Charles. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et de servir à titre de chimiste consultant. Sans votre point de vue, support et participation active, mon projet n'aurait jamais pris autant d'ampleur.

Durant mon doctorat, j'ai eu la chance d'effectuer deux stages de recherche en Allemagne qui furent très formateurs. *I'd like to thanks Joachim Spatz for accepting me as a foreigner researcher for these two amazing research stays. I'd like to thanks Chiara, Dirk, Rebecca, Julia, Tina, Volker, Carolina, Dimitris, Marian, Conny and all the others. You lighten up my stay, introduced me to great food with the "feed them all lunch" and how beautiful and wonderful Germany truly is. Dimitris, your experience and scientific rigour on how correctly define novel experiments actively participated into shaping me as a better scientist, I sincerely thank you. Chiara and Dirk, you were my closest friend. It would have not been the same without you. All those chats that we had about anything, but mostly second world war and science, and I really miss all the laugh that we shared. I'm also glad that I brought some knowledge from weird stuff available on the internet such as the "Pen-pineapple apple pen". See you soon and Prost!*

J'aimerais remercier tous mes amis. Plus particulièrement Thierry, pour m'avoir appris que le mot *naïf* a été retiré du dictionnaire. Heureusement que tu es là. Plus sérieusement, merci d'avoir été un *partner* parfait tout au long du baccalauréat. De m'avoir accompagné dans mes projets d'implications étudiantes (et surtout, de m'y avoir initié!) et de m'avoir servi de maître en autodéfense intellectuel. Martin, *my man*, on partage tellement de passion similaire, en passant du mélodique death métal au *anime*, merci d'être mon confident, *partner* de show, de gaming et gentlemen avec lequel je partage mon amour pour le scotch et les fins spiritueux. Tellement de rire et de discussions qui débouche sur des sujets différents, pour aux finales, ne jamais finir par parler du sujet initial. Merci aussi à Shawn, pour avoir été un de mes premiers

amis à l'Université. Merci d'avoir été une source inépuisable d'inspiration pour des *memes* tel Co-shawn, Shawn-izard et faire des co-Shawn-eries (Crédit à Joanie pour celui-là). Merci d'avoir supporté notre humour un peu pré pubère et cynique. J't'aimes fort et ne change pas.

J'aimerais aussi remercier les membres du Vestiaire. Petite tranche de vie, le seul sport que j'ai vraiment joué « compétitif », c'est le *kinball* pendant au moins 5 ans. Tsé, bonjour la virilité. C'est récemment que vous m'avez accueilli dans votre salle de jeu qu'est le vestiaire. Vous m'avez initié au crossfit dans un environnement super *friendly*, où ton seul réel adversaire, c'est toi-même. Durant cette dernière année, vous avez été une deuxième famille pour moi. Vous m'avez indirectement supporté et permis de passer au travers de l'épreuve la plus difficile de ma vie jusqu'à présent. Vous m'avez appris à repousser mes limites personnelles et à me dépasser. Merci à tous les coachs, Karim, Manu, Karen, Cédric, A.-F., Mirakim, Joe et tous les autres. Mention spéciale à Karen qui illumine nos matins avec une bonne dose de sourires et de bonne énergie contagieuse. Sérieux, je ne suis pas de bonne humeur si je manque mes mercredis matins au vestiaire. Merci énormément à Manu. C'est probablement super insignifiant et davantage une blague, mais avoir reçu le prix « Emmanuelle Blais » pour l'éthique sportive m'a tellement fait chaud au cœur en cette année, t'as même pas idée. J'avais peut-être même trainer mon trophée jusqu'en Allemagne. Merci à tous d'être une source d'inspiration et de persévérance. Vous êtes probablement l'un de mes plus grands regrets que j'ai quant au fait de devoir m'éloigner pendant deux ans et de m'ennuyer du Québec.

J'aimerais remercier ma famille, Alexandre, Noémie, mon père Marc et ma mère Lynda. Papa, t'as toujours dit que j'étais davantage un trouveur plutôt qu'un chercheur et que je n'aimais pas les zones grises dans la vie. T'as effectivement *sizer* mon Ph. D. en une phrase *I guess*. Merci de m'avoir supporté, m'écouter parler de chimie et de mécanique quantique même si tu ne comprenais pas tout et surtout, de m'avoir appris à ne pas hésiter à poser des questions, surtout en science. Merci d'avoir nourri ma curiosité. Maman, tu me manques, j'aurais aimé que tu puisses lire ces mots. Merci de m'avoir écouté et encouragé dans tous mes projets, académiques ou non, d'avoir gardé un moral de feu jusqu'à la fin. Te perdre m'a abruptement rappelé à quel point la recherche dans le domaine médical est importante et à quel point la rigueur est essentielle. J'espère qu'avec ces cinq années de recherche, j'aurai fait un petit bout de chemin dans la bonne direction qu'est la compréhension du cancer. Je vais continuer ma

quête en ce sens aussi. Je t'aime et merci encore de m'avoir poussé, encouragé et supporté jusqu'à la fin.

Finalement, les derniers et non les moindres, j'aimerais remercier ma *partner in crime*, ma meilleure amie et l'amour de ma vie Joanie. Partager mon quotidien avec toi est mon plus grand privilège outre jaser, rire et chialer...surtout chialer. Je sais que ces dernières années n'ont pas été de tout repos, surtout pour toi. Tu as su m'épauler dans tous les moments clés de mon Ph. D., même à distance, incluant mes moments de stress intenses, mon humeur bougonne et héritable qui m'ont valu entre autres divers surnoms tels *grosse GouGou fru*. Tu me ramènes les pieds sur terre quand j'en ai le plus besoin, tu me rassures et m'encourage dans tout ce que j'entreprends, même à contrecœur parfois si cela implique que l'on se sépare pour un p'tit moment. Je le dis souvent, je ne serais pas là où je suis rendu maintenant, ni avec toutes ces distinctions si tu n'avais pas été là dès le début. C'est probablement pourquoi j'ai décidé de te demander de m'épouser deux fois...OK ma première demande était bien trop *lame* et mauvaise, j'ai rectifié le tir j'espère. Je t'aime, et merci de bien vouloir m'accompagner dans de nouvelles aventures. Aussi, je remercie Georges-Henri, notre petit rayon de soleil. Malgré le fait que tu peux être particulièrement détestable par moment, ton sourire illumine nos matins, même si on dort comme de la mer**. Même si ça fait seulement quelques mois que tu es parmi nous, tu m'as déjà appris à faire preuve d'adversité et de résilience dans la vie. Tsé, ce n'est pas grave si mes « affaires » en chimie ne fonctionnent pas, toi tu es là pour me montrer qu'elle, la biologie, fonctionne à merveille.

Je remercie également les différents organismes subventionnaires tels le CRNSG et le FQRNT qui ont supporté mes recherches depuis le premier jour. J'aimerais remercier la société canadienne de chimie, principalement la division de chimie analytique, le CREATE et la *Society for Applied Spectroscopy (SAS)* pour m'avoir offert la chance de présenter mes recherches dans diverses conférences internationales.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de thèse, Antonella Badia, Patrick Hayes et Paolo Actis (Université de Leeds, R.-U.) d'évaluer les travaux de ma thèse. Vos commentaires, idées et opinions ont contribué de manière significative à l'amélioration de ce travail

1. Introduction

1.1. Signalisation et métabolisme cellulaire

La cellule, l'unité de base de tout organisme vivant, est d'une incroyable complexité biochimique impliquant l'action de diverses enzymes, métabolites et autre entité moléculaire, le tout orchestré à la perfection. Parmi ses propriétés exceptionnelles, les cellules sont aptes à communiquer, sonder et interagir avec leur environnement immédiat en plus d'être capables de s'adapter à leur environnement. Pour assurer la communication intra- et intercellulaire, une cellule de signalisation sécrète divers messagers chimiques (Fig. 1.1). Ces messagers diffusent ensuite dans l'environnement extracellulaire jusqu'à l'atteinte d'un récepteur moléculaire spécifique sur la cellule cible. Cet événement de reconnaissance entre le messager et son récepteur moléculaire induit une cascade de réactions biochimiques intracellulaires. Ceci permet le transit du signal provenant de l'association entre le récepteur et le messager menant ultimement à une réponse biologique adéquate (e.g. sécrétion de vésicules) par la cellule cible. Néanmoins, si une cellule ne possède pas le récepteur moléculaire sélectif au messager chimique sécrété par une cellule de signalisation, aucune réponse biologique ne sera déclenchée. La nature du messager sécrété a donc une importance capitale sur la réponse biologique observée.

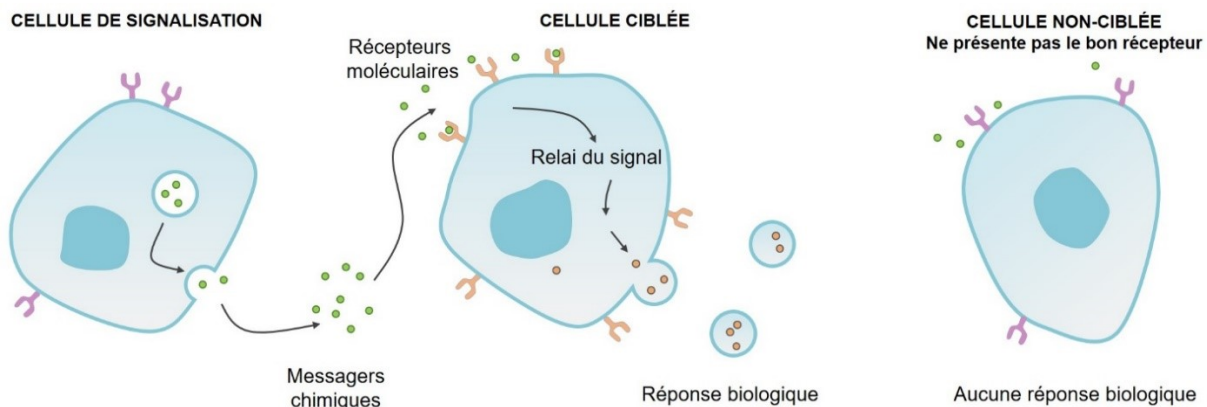


Figure 1.1 Schématisation de mécanisme de signalisation intercellulaire par exocytose de messagers chimiques.

Outre leur rôle en tant que médiateur de la signalisation cellulaire, où l'identité des messagers dicte la réponse biologique, la concentration locale en messagers chimiques est aussi

un facteur clef sur les fonctions cellulaires. Par exemple, la sécrétion de messagers permet la formation d'un gradient de concentration dans l'espace. Les cellules possèdent une boussole interne leur permettant de détecter ces gradients extracellulaires et de s'en approcher, ou bien de s'en éloigner¹. Ce choix est entre autres dicté par la nature du messenger chimique. Ce phénomène, connu sous le nom de chimiotaxie, est à l'origine du déplacement d'une cellule (procaryote² ou eucaryote¹) vers des nutriments, et de s'éloigner des toxines environnantes. Les gradients de concentration de messagers chimiques sont impliqués dans une panoplie de processus biochimiques et biologiques tel le recrutement de cellules inflammatoires vers des sites infectieux³, la régénération tissulaire¹, la prolifération cellulaire⁴, l'apoptose⁵⁻⁶, la régulation du métabolisme du glucose⁴, ou encore, la différenciation cellulaire lors de l'embryogenèse⁷⁻⁸.

Durant leur cycle de vie, les cellules libèrent et consomment différents métabolites dans l'environnement extracellulaire n'agissant pas nécessairement comme messenger. La composition de cet environnement a un impact sur le métabolisme cellulaire, stimulant l'adaptation des cellules. Prenons par exemple les cellules β se retrouvant dans le pancréas. Ces cellules sont à l'origine de la régularisation du taux d'insuline dans le sang (Fig.1.2). Typiquement, le glucose entre dans ces cellules à l'aide des transporteurs de glucose (*Glut2*) et métabolisé en adénosine triphosphate (ATP) via la glycolyse et le cycle de Krebs au sein des mitochondries⁹. L'augmentation intracellulaire d'ATP dans les cellules pancréatiques β , et donc du ratio ATP/ADP, induit un changement quant à l'état énergétique de la cellule. Ce changement provoque la fermeture des canaux potassiques (K_{ATP}) induisant la dépolarisation de la membrane¹⁰ aboutissant à l'ouverture des canaux calciques qui stimule la libération d'insuline¹¹. Néanmoins, si les cellules se retrouvent dans un environnement pauvre en glucose, elles s'adaptent et utilisent des sources d'énergie alternative afin de soutenir à leur demande énergétique. Dans le cas des cellules β , la génération d'ATP peut être facilitée en présence d'acides aminés grâce à l'activation de la glutamate déshydrogénase (GDH). La GDH catalyse la conversion du glutamate en α -cétoglutarate, intermédiaire essentiel du cycle de Krebs, permettant la genèse d'ATP et ainsi catalyser la libération d'insuline¹²⁻¹³.

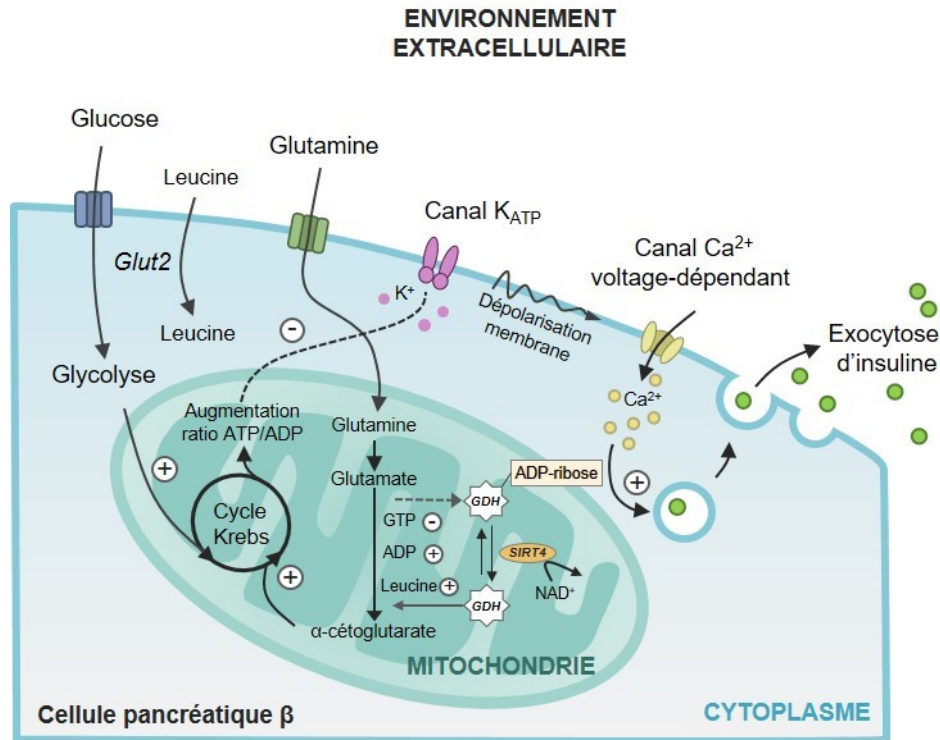


Figure 1.2 Stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β . Le glucose est l'entité moléculaire ayant le plus grand potentiel de stimulation de libération d'insuline par les cellules pancréatiques β . La GDH est étroitement régulée de manière allostérique par l'acide aminé L-leucine. La sensibilité de la GDH pour la leucine dépend du ratio GTP/ADP dans l'environnement cellulaire ; l'activité de la GDH est donc stimulée en présence d'ADP et de L-leucine, mais inhibée en présence de GTP. Ainsi, dans un état favorisant un faible ratio GTP/ADP, tel un environnement pauvre en glucose, la GDH s'active en présence de leucine et provoque l'exocytose d'insuline. Dans ce cas de figure, la GDH est activée par l'enzyme SIRT4¹³.

Le cas des cellules β illustre bien plusieurs points importants : (1) l'impressionnante capacité d'adaptation des cellules en présence de différents stimuli (riche vs pauvre en glucose), (2) la complexité des mécanismes de régulation cellulaire qui impliquent plusieurs entités moléculaires différentes et finalement, (3) les conséquences cliniques associées au dérèglement du métabolisme ou aux mécanismes de signalisation cellulaire. En effet, un dysfonctionnement du mécanisme de libération d'insuline par les cellules β est à l'origine du diabète de type 2¹⁴, condition clinique touchant une population estimée à plus de 171 millions d'individus¹⁵.

Outre le diabète, une panoplie de maladies sont associées aux dérèglements des mécanismes de signalisation cellulaire. Néanmoins, plusieurs de ces mécanismes d'action demeurent nébuleux. Par exemple, les maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer¹⁶⁻¹⁷, la maladie de Parkinson¹⁸⁻¹⁹, la dépression²⁰, la dépendance aux drogues²¹, ou encore la schizophrénie²² sont tous associés à un changement de la neurochimie du cerveau impliquant les neurotransmetteurs : les messagers chimiques du cerveau. Ces changements sont généralement associés à un déséquilibre dans les concentrations de certains neurotransmetteurs. Un déficit en dopamine (DA) par rapport aux autres neurotransmetteurs est observé, entre autres, dans le cas de la maladie de Parkinson¹⁹. Ces exemples montrent que l'évaluation locale de la concentration de métabolites sécrétés, ou consommé par des cellules est essentielle à l'approfondissement des connaissances sur divers processus biologiques. Une compréhension plus approfondie et globale du métabolisme et des mécanismes de signalisation cellulaire est essentielle pour effectuer des percées dans le domaine médical.

1.2. Méthodes analytiques contemporaines

Actuellement, diverses méthodes analytiques permettent la détection de molécules sécrétées par des cellules. Les défis de détection, associés aux faibles concentrations d'analyte libéré par les cellules pour un court laps de temps, peuvent facilement être relevés en utilisant des méthodes électrochimiques comme l'ampérométrie, la voltampérométrie ou la microscopie électrochimique à balayage (SECM)²³⁻²⁵. Les capteurs électrochimiques, pouvant être positionnés près des sites de libération des cellules et miniaturisés afin de minimiser les dommages physiques aux cellules²⁶, permettent la détection de molécules électro-actives. Typiquement, les capteurs électrochimiques sont utilisés pour l'analyse de superoxydes²⁷, d'espèce réactive de l'oxygène (ROS)²⁸, ou encore de neurotransmetteurs monoamines telles la DA, la sérotonine (5-HT), l'épinéphrine (EP) et la norépinéphrine (NE)²⁹. Leur détection par voie électrochimique est néanmoins difficile, puisque plusieurs interférents moléculaires présents dans des matrices biologiques s'oxydent dans des plages de potentiels similaires. Par exemple, l'acide ascorbique (AA), l'acide urique (UA) ainsi que EP s'oxydent tous à des potentiels similaires à celui de la DA, entraînant la superposition des signaux en voltampérométrie³⁰⁻³¹. Bien que l'électrochimie soit la méthode standard pour l'analyse de

neurotransmetteurs, son utilisation demeure limitée puisqu'elle requiert un analyte électro-actif dans la plage de potentiel étudiée, et ce, en absence d'interfèrent en plus d'offrir une faible capacité de multiplexage.

Les acides aminés agissant comme messagers chimiques sont généralement analysés par méthode chromatographique comme la chromatographie liquide (LC)³² ou encore l'électrophorèse capillaire (EC)³³ généralement couplés à la spectrométrie de masse (MS)³⁴. Contrairement aux méthodes électrochimiques, la LC/EC-MS offre une excellente capacité d'analyse à haut criblage permettant l'analyse simultanée de plusieurs messagers chimiques en plus de permettre leur identification. Néanmoins, ces méthodes souffrent d'une pauvre résolution spatio-temporelle, puisqu'elle requiert le prélèvement local de l'échantillon à l'aide d'une micropipette³⁵⁻³⁶, ou peuvent nécessiter la dérivation de l'analyte préalablement à sa détection. Malgré les efforts consacrés au développement de méthodes d'échantillonnage, de dérivation et d'analyse directs afin d'augmenter la résolution spatio-temporelle³⁷, la résolution temporelle disponible, correspondant à une fréquence d'analyse typique de 0.05 Hz (i.e. 20 secondes entre chaque échantillonnage/analyse)³⁸⁻³⁹, permet difficilement le suivi des changements rapides de concentration des messagers chimiques lors d'évènements de sécrétion cellulaire.

Les sécrétions cellulaires peuvent aussi être analysées à l'aide de méthodes spectroscopiques comme la microscopie de fluorescence. Cette dernière est largement utilisée en sciences biologiques afin de mesurer l'activité cellulaire à l'aide de protéine fluorescente génétiquement encodées⁴⁰⁻⁴² sensibles aux flux d'ions Ca^{2+} et aux ROS⁴³. L'usage de ces protéines permet entre autres de mesurer l'activité neuronale *in vivo* et *in vitro* de manière peu invasive et de manière localisée⁴⁴. Bien que hautement sensible et offrant une excellente résolution temporelle, impliquant typiquement une fréquence d'acquisition de 10 Hz⁴⁰ et une résolution spatiale pouvant atteindre l'ordre de quelque dizaines de nanomètres⁴⁵, l'usage de protéines fluorescentes peut provoquer un changement biochimique au niveau cellulaire pouvant influencer les conclusions biologiques. Aussi, l'usage de protéines fluorescentes ne permet que l'analyse indirecte de messagers chimiques en plus d'être limité à ceux impliquant un flux d'ions Ca^{2+} . La nature des messagers chimiques demeure donc inconnue. La microscopie de fluorescence n'est donc pas adéquate pour effectuer des études davantage exploratoires visant

à identifier différents messagers chimiques impliqués dans des évènements de sécrétions cellulaires.

Afin d'être en mesure d'établir un portrait global des mécanismes de signalisation moléculaire du métabolisme cellulaire, une nouvelle méthodologie doit être développée. L'objectif de cette thèse sera consacré au développement d'une technique analytique adaptée aux mesures de métabolites extracellulaires sécrétés par des cellules. En ayant comme principal objectif de combler les lacunes actuelles, cette méthode se doit d'être : non destructive, universelle et nécessitant aucun marquage, permettre l'identification du, ou des, messagers chimiques sondés, être hautement sensible tout en permettant une analyse à haut criblage afin de permettre le suivi rapide et simultanés de divers messagers chimiques lors d'évènements de sécrétion cellulaire. Idéalement, cette méthodologie devra aussi permettre des analyses localisées afin de capturer la libération hétérogène de messagers chimiques, provenant de zone ponctuelle bien précise au sein d'un ensemble de cellules. Par exemple, les neurones dopaminergiques originaires du mésencéphale sécrètent spécifiquement de la DA lors de la transmission synaptique. Ces neurones expriment aussi le transporteur vésiculaire de glutamate (VGLUT)⁴⁶, indiquant que ces neurones colibèrent le Glu à partir de certaines varicosités axonales bien précises lors de la transmission. Ce phénotype démontre bien la nécessité d'avoir une méthode capable de sonder l'environnement extracellulaire local, où la composition des messagers chimiques peut varier dans l'espace.

En utilisant les propriétés corpusculaires de la lumière, la spectroscopie Raman, spectroscopie vibrationnelle basée sur la collision inélastique entre un photon et une molécule, permet l'identification de l'espèce moléculaire. Il peut être difficile de représenter de manière empirique une équation montrant l'intensité de diffusion Raman. Néanmoins, l'équation suivante (Éq. 1.1) met en relation les divers facteurs moléculaires ayant un impact sur la puissance de rayonnement de la diffusion Raman Φ_R ⁴⁷ :

$$\Phi_R \propto \sigma(v_{ex})v_{ex}^4 E_0 n_i e^{-E_i/kT} \quad (\text{Éq. 1.1})$$

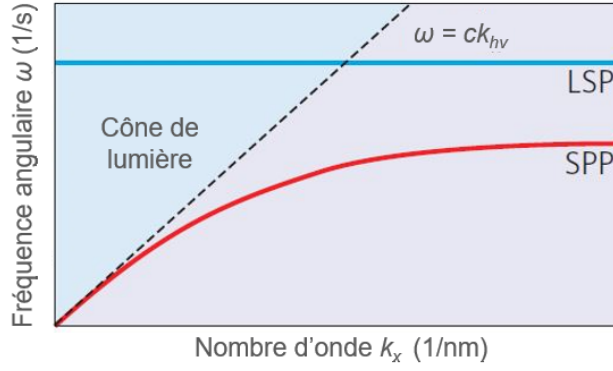
Où $\sigma(v_{ex})$ correspond à la section efficace de diffusion Raman à la fréquence d'excitation v_{ex} , E_0 à l'irradiance de la source d'excitation, v_{ex} à la fréquence d'excitation, n_i au nombre de molécule

se trouvent au niveau vibrationnel initial i et le terme exponentiel est le facteur de Boltzmann pour l'état énergétique i .

La section efficace de diffusion Raman $\sigma(v_{ex})$ par molécule se situe généralement entre $10^{-31} - 10^{-29} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$ tandis que la fluorescence offre une section efficace de l'ordre de $10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$, faisant de la spectroscopie Raman une méthode analytique de faible sensibilité⁴⁸. Pour pallier au manque de sensibilité du Raman, une source de forte irradiane, comme un laser de haute puissance, peut être utilisée. Aussi, $E_0 \propto |E|^2$ où E correspond à l'intensité du champ électrique, montrant que l'augmentation locale du champ électrique permettrait aussi d'accroître l'intensité du signal Raman. Or, certains matériaux possèdent des propriétés physiques permettant de localement augmenter l'intensité du champ électrique.

1.3. Matériaux plasmoniques

Les électrons de la bande de conduction d'un métal noble, tels l'or et l'argent, peuvent osciller collectivement sous l'influence d'une radiation électromagnétique. Cette oscillation collective, nommée plasmon, est à l'origine de l'augmentation d'extinction de la lumière lorsque la fréquence d'oscillation des électrons coïncide avec la fréquence de la radiation⁴⁹. Lorsqu'un métal plasmonique est excité à l'interface d'un diélectrique, les conditions de résonances sont gouvernées par les propriétés physiques du diélectrique situé dans un volume de quelques centaines de nanomètres de l'interface⁵⁰. Pour qu'il y ait résonance entre la lumière et les plasmons de surface, les vecteurs d'ondes de la lumière (k_{hv}) et des plasmons de surface (k_{sp}) doivent être égaux. En d'autres mots, les photons doivent avoir la bonne énergie afin d'induire la polarisation des électrons de la bande de conduction du métal. Néanmoins, le vecteur d'onde de la lumière se propageant dans l'air est toujours inférieur à celui du plasmon de surface ($k_{hv} < k_{sp}$) ne permettant pas l'excitation directe des plasmons de surface propagatifs (SPP) (Fig. 1.3)⁵¹. L'excitation directe des SPP par la lumière nécessite une configuration optique différente afin d'augmenter k_{hv} ou de diminuer k_{sp} ⁵².



$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\lambda)\epsilon_s(\lambda)}{\epsilon_m(\lambda) + \epsilon_s(\lambda)}}$$

$$k_{hv} = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda}$$

Figure 1.3 Excitation des plasmons de surface par la lumière. L'excitation d'un plasmon de surface propagatif (SPP) n'est pas directement possible sur un film de métal noble macroscopique puisque le vecteur d'onde du plasmon k_{sp} (ligne rouge) est toujours plus grand que celui de la lumière k_{hv} (ligne hachurée). Inversement, dans le cas d'un plasmon de surface localisé (LSP), il existe au moins une fréquence à laquelle les vecteurs d'onde sont égaux, permettant ainsi une excitation (ligne bleu). Adapté et traduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Springer Nature, Nature Photonics, référence 51 © 2011. k_{sp} correspond au vecteur d'onde du plasmon de surface, ω est la fréquence angulaire, $\epsilon_m(\lambda)$ et $\epsilon_s(\lambda)$ sont respectivement la constante diélectrique du métal et du milieu environnant en fonction de la longueur d'onde et c correspond à la vitesse de la lumière.

Or, si la taille de la structure métallique est inférieure à la longueur d'onde d'excitation, une nanoparticule par exemple, le plasmon de surface peut être directement excité⁴⁹. Dans ce cas de figure, les nanostructures vont ressentir momentanément un champ électrique « quasi stationnaire ». Les électrons de la bande de conduction seront repoussés, ou attirés selon la polarité de la radiation incidente (Fig. 1.4).

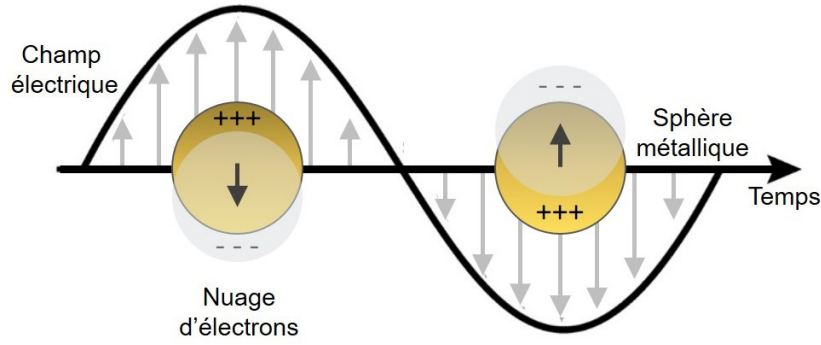


Figure 1.4 Excitation directe du LSPR par la lumière. L'oscillation de la radiation électromagnétique induit une polarisation des électrons composant la bande de conduction du nanomatériau. Les électrons entrent en résonance pour une longueur d'onde précise, lorsque les vecteurs d'ondes sont égaux.

Le LSP peut donc entrer en résonance (LSPR) à au moins une fréquence précise (Fig. 1.3)⁵¹. L'excitation du LSPR de nanoparticules est à l'origine de la forte extinction de la lumière, menant à une forte coloration du milieu si la résonance se situe dans le visible. Grâce à cette coloration, les solutions colloïdales furent utilisées depuis des millénaires dans la production d'œuvre d'art de toute sorte, tel le masque de sépulture du Pharaon Toutankhamon (*ca.* 1323 av. J.-C.)⁵³, la coupe de Lycurgue⁵⁴, ou encore les vitraux dans les cathédrales européennes⁵⁰. La fréquence de résonance du LSP dépendant de la taille, la forme, la composition de la nanostructure ainsi que de la constante diélectrique de l'environnement externe immédiat. L'extinction peut être rationalisée par l'équation (Éq. 1.2) suivante :

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 N a^3 \epsilon_{out}^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\epsilon_i(\lambda)}{(\epsilon_r(\lambda) + \chi \epsilon_{out})^2 + \epsilon_i(\lambda)^2} \right] \quad (\text{Éq. 1.2})$$

Où $E(\lambda)$ correspond à l'extinction de la particule, a correspond à la taille de la particule, ϵ_{out} correspond à la constante diélectrique de l'environnement externe à la particule, λ la longueur d'onde, N représente le nombre d'éléments finis polarisables de la structure, ϵ_r et ϵ_i sont respectivement la partie réelle et imaginaire de la constante diélectrique du métal composant la particule, χ est un facteur d'anisotropie, prenant en compte la géométrie asymétrique de la particule. Dans le cas d'une sphère $\chi = 2$.

L'importante coloration des nanoparticules et leur sensibilité à leur environnement diélectrique a mené à leur grande utilisation dans le domaine scientifique, notamment en tant que marqueur dans des essais immunologiques⁵⁵⁻⁵⁷, biocapteurs⁵⁸⁻⁶⁰ et en imagerie cellulaire⁶¹⁻⁶².

1.4. Spectroscopies exaltées par les métaux

L'excitation du LSPR a pour conséquence d'augmenter localement le champ électrique en périphérie de la nanostructure, en confinant ce dernier dans des régions situées à environ 10 à 40 nm de la surface de la nanostructure dans l'axe perpendiculaire à la direction de propagation de la lumière incidente^{50, 63}. Une molécule se retrouvant dans ces zones de hauts champs va ressentir ce champ électrique et verra certaines de ces propriétés photo-physiques amplifiées. Par exemple, l'excitation du LSPR permet d'exalter l'émission et la diffusion de molécules, donnant lieu à la fluorescence exaltée par les métaux (MEF)⁶⁴ et la diffusion Raman exaltée par les surfaces (SERS)⁶³⁻⁶⁵. L'équation 1.1 montre que la diffusion Raman est proportionnelle à l'intensité locale du champ électrique induit par la radiation provenant d'une source de haute irradiance. Lorsque couplé au LSPR d'une nanoparticule, la diffusion Raman est exaltée de plusieurs ordres de grandeur, correspondant à une amplification moyenne de 10^8 - 10^9 ⁶⁶. Une telle amplification permet la détection de molécule unique⁶⁷⁻⁶⁸, faisant de la spectroscopie Raman l'une des spectroscopies les plus sensibles une fois couplée au LSPR.

Lorsqu'une nanoparticule présente des aspérités ou des pointes en surface (e.g. un triangle ou une étoile), le confinement du champ électrique à l'apex de ces pointes est encore plus important. Ce confinement, nommé effet d'antenne (*Lightning rod effect*)⁶⁹, amplifie localement le champ électrique d'environ 10 à 25 fois plus que la valeur moyenne d'amplification d'une surface sans pointe telle qu'une sphère⁶⁹⁻⁷⁰ (Fig. 1.5). Aussi, il est possible de décupler davantage l'intensité du champ électrique local en approchant deux nanostructures l'une près de l'autre. Lorsque la distance entre ces deux nanostructures est très petite, des points chauds (*hotspots*)⁷¹, zones de hauts champs électriques, sont générés dû au couplage entre les champs électriques des plasmons (Fig. 1.6)⁷². Or, il fut rapporté que la plupart des spectres SERS mesurés sont dominés par la diffusion Raman originaire de ces points chauds⁷³⁻⁷⁵. La

génération de points chauds est donc essentielle dans la confection de capteur SERS ayant une haute sensibilité.

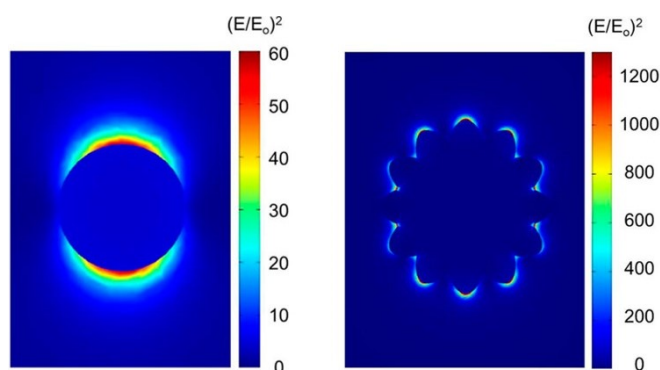


Figure 1.5 Densité optique $(E/E_0)^2$ produite par une nanosphère d'or de 60 nm excitée à une longueur d'onde de 550 nm (gauche) et une nanoframboise d'or de 90 nm excitée à une longueur d'onde de 590 nm (droite). Les deux nanoparticules sont excitées dans l'eau. Adapté avec la permission de la référence 70 © 2015, American Chemical Society.

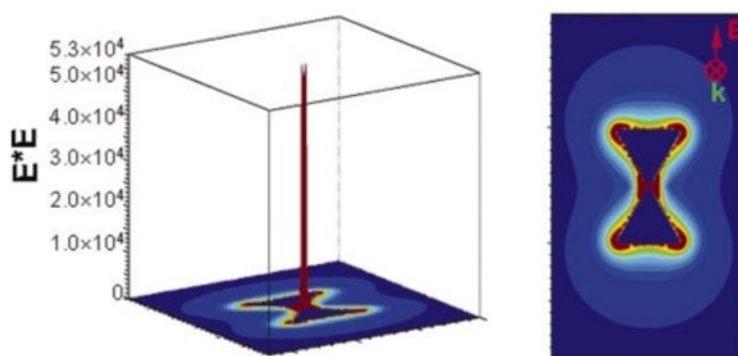


Figure 1.6 Amplification du champ électrique local entre les deux pointes d'un dimer composé de nanotriangles d'argent excité à la longueur d'extinction maximale de 932 nm. Adaptée de la référence 69 © 2004, avec la permission de AIP Publishing.

Pour y arriver, divers capteurs SERS ont été générés soit par autoassemblage (approche *Bottom-up*), ou par lithographie (approche *Top-down*) afin de créer des capteurs ayant une grande densité de points chauds par unité de surface⁷⁶. Les méthodes de lithographie permettent l'obtention de réseaux ordonnés et reproductibles, où la forme des nanostructures et la distance entre elles peuvent être optimisées à l'aide de simulations. Cependant, leur génération est limitée

par un faible rendement et un coût élevé de production. Inversement, la génération de capteurs par autoassemblage offre de bonnes performances analytiques avec un haut rendement à faible coût. Néanmoins, ces capteurs souffrent d'une faible reproductibilité due à l'obtention d'arrangement aléatoire en surface des capteurs. Ces réseaux aléatoires offrent un faible contrôle sur la distance interparticules, le facteur le plus important dictant l'amplification de la diffusion Raman. De plus, ces points chauds seront distribués aléatoirement à la surface du capteur, limitant la reproductibilité des mesures.

Malgré ces défis de fabrication, une grande variété de capteurs basés sur le SERS ont été développés afin de sonder l'environnement intra-⁷⁷⁻⁷⁹ et extracellulaire⁸⁰⁻⁸¹ de manière directe, en utilisant la signature intrinsèque des molécules en proximité de sondes plasmoniques, ou bien, en utilisant des rapporteurs Raman⁸²⁻⁸³. Spécifiquement, le pH local de l'environnement cellulaire fut mesuré à l'aide de sonde SERS sensible au pH⁸⁴. Cependant, l'usage de nanoparticules pour sonder le pH dans un environnement cellulaire est difficile puisque le signal SERS dépend grandement de l'état d'agrégation des nanoparticules (e.g. distance interparticules) qui peut varier de manière importante dans une cellule. Pour relever ce défi, l'usage de nanoparticules protégées par une couche moléculaire de protéine (BSA) a permis de mesurer le pH intracellulaire de manière robuste⁸⁵. Outre le pH, les dérivés cellulaires ROS, correspondant aux radicaux dérivés du métabolisme de l'oxygène tel $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 , $\text{ROO}\bullet$, ou encore, l'oxygène à l'état singulet sont impliqués dans différentes activités physiologiques comme la signalisation cellulaire, la régularisation de l'expression des gènes et de la réponse immunitaire⁸⁶. Par contre, une concentration trop élevée en ROS peut induire des stress oxydatifs aux différentes structures cellulaires comme les lipides et protéines membranaires, ainsi qu'à l'ADN, menant à diverses maladies. Le SERS fut appliqué afin de détecter le H_2O_2 endogène dans des cellules vivantes⁸⁷, ou encore pour mesurer les dommages *in vitro* des ROS sur la chaîne de transfert d'électrons (ETC) dans les mitochondries⁸⁸. Les espèces gazeuses comme le monoxyde de carbone (CO)⁸⁹ et le monoxyde d'azote (NO)⁹⁰ sont aussi de puissants agents de communication cellulaire qui furent détectés par SERS. Finalement, différents capteurs employant le SERS ont été développés comme outils cliniques permettant des analyses servant à la prévention⁹¹⁻⁹², au diagnostic⁹³, à l'identification de cancer⁹⁴⁻⁹⁶, à l'analyse *ex vivo* de tumeurs durant des opérations chirurgicales guidées par SERS⁹⁷⁻⁹⁹, à l'analyse *in vivo*

de cellules cancéreuses par endoscope SERS¹⁰⁰⁻¹⁰³ et même comme outil théranostique¹⁰⁴⁻¹⁰⁸, permettant à la fois un diagnostic et un traitement au site d'analyse.

1.5. Méthodes d'analyse spectrale

Afin d'employer le SERS dans des applications diagnostiques, ou même exploratoires, il est important de correctement analyser les divers spectres acquis afin d'extraire l'information biologique d'intérêt. Lors de ces analyses, chaque spectre SERS est généralement catégorisé, à l'aide d'algorithmes supervisés ou non, en se basant sur des caractéristiques spectrales bien précises. Les méthodes de classification non supervisées impliquent généralement le regroupement des données en différents sous-groupes (*clusters*). Les spectres présentant des patrons vibrationnels similaires sont regroupés entre eux. Néanmoins, aucune information quant à l'identité de la molécule n'est disponible. Les méthodes classiques d'analyses non supervisées sont le regroupement hiérarchique (HCA)¹⁰⁹ ou encore le regroupement de *k*-moyennes (*k-means clustering*)¹¹⁰. L'analyse de composantes principales (PCA) est aussi une approche non supervisée largement utilisée en spectroscopie vibrationnelle. La PCA est typiquement employée pour séparer différents patrons vibrationnels¹¹¹, permettant ainsi une ségrégation des molécules détectées dans l'espace des composantes principales (PCs), lorsque les patrons sont suffisamment distincts (Fig. 1.7)¹¹². L'expérimentaliste peut ensuite analyser des molécules connues, dans des conditions similaires, afin d'identifier la nature des différents regroupements.

Lorsque l'analyse de spectres SERS sert à des fins de diagnostics médicales, l'utilisation d'une méthode d'analyse supervisée est privilégiée. Dans ces méthodes supervisées, le résultat de l'analyse dépend de l'identité (i.e. la classe) fournie par l'expérimentaliste. Les méthodes d'analyse supervisées doivent en premier lieu être « entraînées » à l'aide de données de références, préalablement étiquetées (*labeled*), afin de générer un classifieur. Ce classifieur est par la suite capable de catégoriser des données testées, grâce aux généralisations extraites des données d'entraînement. Les méthodes classiques d'analyses supervisées sont les discriminants linéaires (LDA), les machines à vecteurs de supports (SVM) ainsi que les réseaux de neurones artificiels (ANN)¹¹³. Néanmoins, les méthodes supervisées permettent difficilement l'identification de nouvelles molécules. Les analyses sont restreintes aux molécules pour lesquelles le classifieur fut préalablement entraîné.

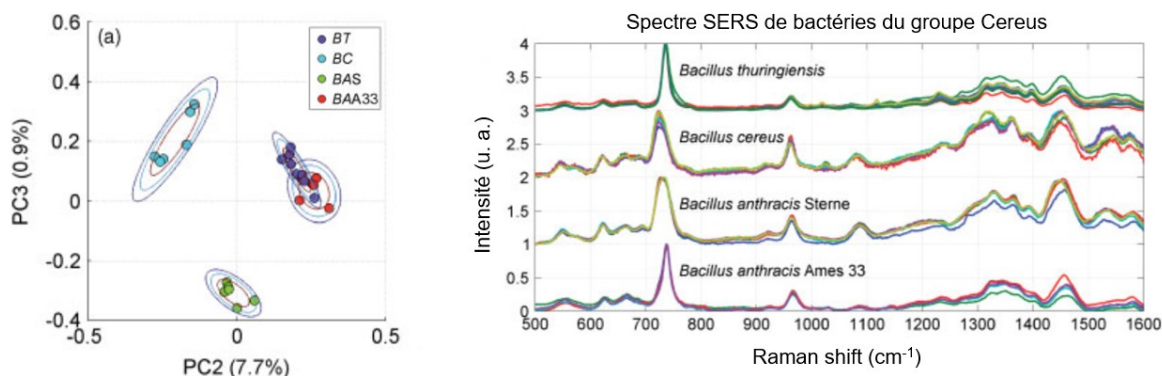


Figure 1.7 Catégorisation de différentes bactéries du groupe *Cereus* (gauche) par analyse de composantes principales (PCA) de différents spectres SERS (droite). *Bacillus thuringiensis* (BT), *Bacillus cereus* (BC), *Basillus anthracis* Sterne (BAS), *Bacillus anthracis* Ames 33 (BAA33). Adaptée avec la permission de la référence 112 Copyright © John Wiley & Sons, Ltd. 2008 Journal of Raman Spectroscopy.

Depuis l'avènement des réseaux neuronaux profonds (DNN)¹¹⁴, nouvelle architecture de réseaux neuronaux permettant l'apprentissage de caractéristiques complexes et abstraites à partir de données réelles, le domaine de l'intelligence artificielle a effectué une percée majeure dans divers domaines scientifiques nécessitant l'utilisation de méthodes d'analyses supervisées. Facilité par le développement de nouveaux processeurs et d'unités computationnelles plus performants¹¹⁵⁻¹¹⁶, les DNN ont été utilisés dans le traitement d'images afin d'effectuer des diagnostics médicales¹¹⁷⁻¹¹⁹, la reconnaissance faciale¹²⁰, la reconnaissance vocale¹²¹, prédire l'activité potentielle de candidats thérapeutiques¹²², prédire l'effet d'une mutation dans l'ADN non codant sur l'expression génétique et les maladies associées¹²³, et même maîtriser des jeux tels que *Go*¹²⁴ et *Space Invader*¹²⁵. Les DNN furent aussi récemment employés pour l'analyse de spectres SERS¹²⁶⁻¹²⁷ et d'image obtenue par diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS)¹²⁸, démontrant leur grand potentiel pour l'analyse de données spectroscopiques complexes. Afin de ne pas représenter les traitements de données effectués par l'intelligence artificielle comme une boîte noire, la prochaine section de la thèse sert à expliquer le fonctionnement général des réseaux neuronaux et comment ces derniers peuvent être appliqués à l'analyse et la classification de spectres SERS.

1.6. Intelligence artificielle

1.6.1. Neurone artificiel

Les ANN, inspirés par le mécanisme d'action de neurones biologiques, correspondent à une méthode d'analyse basée sur l'apprentissage par machine. Le neurone artificiel, ou perceptron, est l'unité élémentaire du réseau et correspond simplement à une fonction mathématique. Afin de générer un ANN, plusieurs neurones sont reliés les uns aux autres de manière analogue au cerveau humain. Typiquement, un neurone artificiel reçoit une ou plusieurs entrées (Fig. 1.8). Ces entrées sont indépendamment et individuellement pondérées par un poids w_i , puis additionnées. Afin d'empêcher un résultat nul suite à l'addition, un biais b non nul supplémentaire est ajouté. Typiquement, la valeur de b se situe entre 0.1 et 1. Le résultat de cette opération est ensuite transféré dans une fonction d'activation. La réponse de cette fonction d'activation correspond à la sortie du neurone artificiel. Ce résultat peut par la suite servir de nouvelle entrée pour le neurone suivant, et ultimement, être utilisé afin d'effectuer des prédictions. De manière analogue à un neurone biologique, les synapses, correspondant au point de connexion entre les neurones, sont représentées par les poids, les dendrites par les signaux d'entrées, la fonction d'activation par le soma puis finalement, le signal de sortie par l'axone d'un neurone biologique.

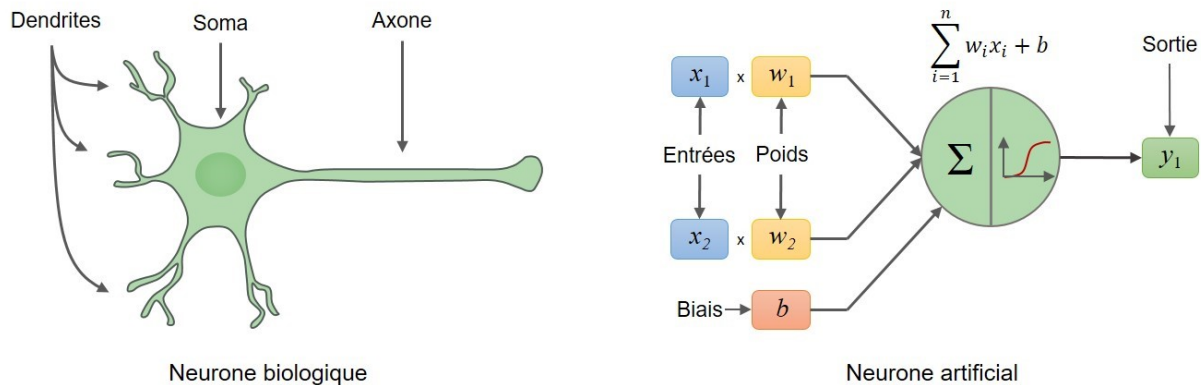


Figure 1.8 Comparaison entre un neurone biologique et artificiel et schématisation mathématique d'un neurone artificiel (perceptron). x_i correspond aux diverses entrées (*inputs*), w_i aux différents poids, b au biais puis y_i au résultat du neurone (*output*). Le résultat de la sommation (fonction d'agrégation) est ensuite transféré à une fonction d'activation (e.g. fonction sigmoïde). La sortie (*output*) du neurone artificiel correspond à la valeur sortante de la fonction d'activation.

1.6.2. Réseau neuronal artificiel

Les neurones artificiels peuvent être agglomérés afin de créer une couche neuronale. Ces couches sont ensuite reliées entre elles afin de générer un réseau neuronal (Fig. 1.9).

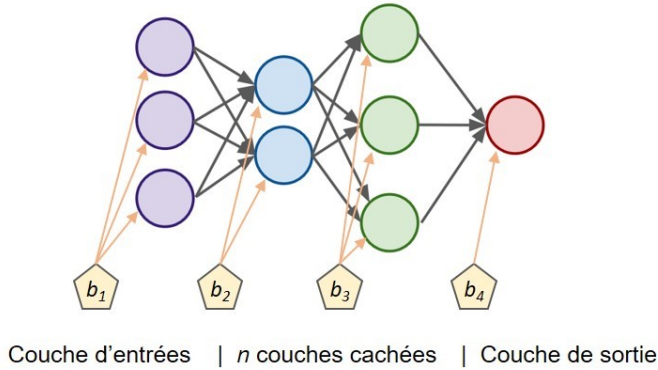


Figure 1.9 Représentation d'un réseau neuronal multicouche composé de la couche de neurones d'entrées, de deux couches cachées et d'une couche de sortie composée d'une seule valeur qui sera utilisée comme prédiction. Chaque cercle représente un neurone artificiel. Les flèches reliant les neurones entre les diverses couches représentent les poids, paramètres d'apprentissage du réseau qui seront variés et optimisés durant la phase d'apprentissage ou d'entraînement. À chaque neurone est additionné un biais, représenté par les divers pentagones.

L'ajout de couches supplémentaires dans un ANN a pour conséquence d'augmenter le niveau d'abstraction des détails qu'un réseau peut apprendre et utilisé pour faire ses prédictions. Dans un réseau, le paramètre permettant l'apprentissage correspond aux divers poids w_i et biais b . Ces poids peuvent être facilement condensés en une matrice \mathbf{W} , où chaque colonne de la matrice correspond à un vecteur composé des différents poids utilisés par un neurone du réseau. Le processus mathématique d'un seul neurone sur un vecteur d'entrée \mathbf{x} et d'un biais \mathbf{b} , utilisant une fonction d'activation f pour la couche n menant à la sortie h peut donc être rationalisé de la manière suivante (Éq. 1.2) :

$$\mathbf{h} = f_n(\mathbf{W}^T \mathbf{x} + \mathbf{b}) \quad (\text{Éq. 1.2})$$

Afin de permettre l'apprentissage du ANN, une fonction de perte, ou d'optimisation, est introduite dans le modèle¹²⁹. Cette dernière sert à mesurer l'écart entre la valeur attendue et la valeur prédite par le modèle. Cette étape d'apprentissage s'effectue sur un ensemble de données, dédiée à l'entraînement, où chaque donnée est préalablement étiquetée. Lors de l'apprentissage, la machine modifie ses poids afin de minimiser l'écart calculé. Plusieurs

fonctions de perte peuvent être employées telles l'erreur moyenne au carré, ou encore la perte d'entropie croisée¹³⁰.

1.6.3. Descente du gradient

Afin d'ajuster ses poids adéquatement, l'algorithme d'apprentissage calcule, dans un premier temps, le gradient (*gradient vector*) de la fonction d'erreur (perte) $\mathcal{L}(\theta)$ ¹³¹. Le gradient indique l'amplitude de croissance, ou de décroissance de l'erreur si la valeur des paramètres d'apprentissages était incrémentée d'une petite quantité. Le vecteur de poids est ensuite ajusté dans la direction inverse du vecteur gradient afin de minimiser l'erreur du réseau¹³²⁻¹³³ (Fig. 1.10). Pour un réseau neuronal composé de j couches, cette étape est répétée jusqu'à l'obtention du couple de paramètres $\theta_j = \{\mathbf{W}, \mathbf{b}\}$ pour chaque couche j du réseau menant ultimement à l'erreur la plus faible. Cette méthode d'optimisation correspond à la descente du gradient (GD). La fonction d'optimisation $\mathcal{L}(\theta)$ peut être schématisée par une surface hautement vallonnée dans l'espace de haute dimension des poids pour un réseau composé de 2 couches (Fig. 1.10), où chaque point de l'espace $\mathcal{L}(\theta)$ correspond à l'erreur associée à la combinaison des divers poids \mathbf{w} et biais \mathbf{b} ¹¹⁴. L'utilisation de l'inverse du vecteur gradient permet de déterminer la direction où la pente descendante est la plus importante, afin de s'approcher d'un minimum local de la courbe, où l'erreur sur la prédiction du réseau est en moyenne moindre. L'équation 1.3 présente le calcul de descente du gradient, où θ_j est ajusté simultanément pour chaque couche j du réseau neuronal et α est un scalaire correspondant à la vitesse d'apprentissage du réseau.

$$\theta_j \leftarrow \theta_j - \alpha \frac{\partial}{\partial \theta_j} \mathcal{L}(\theta_j) \quad (\text{Éq. 1.3})$$

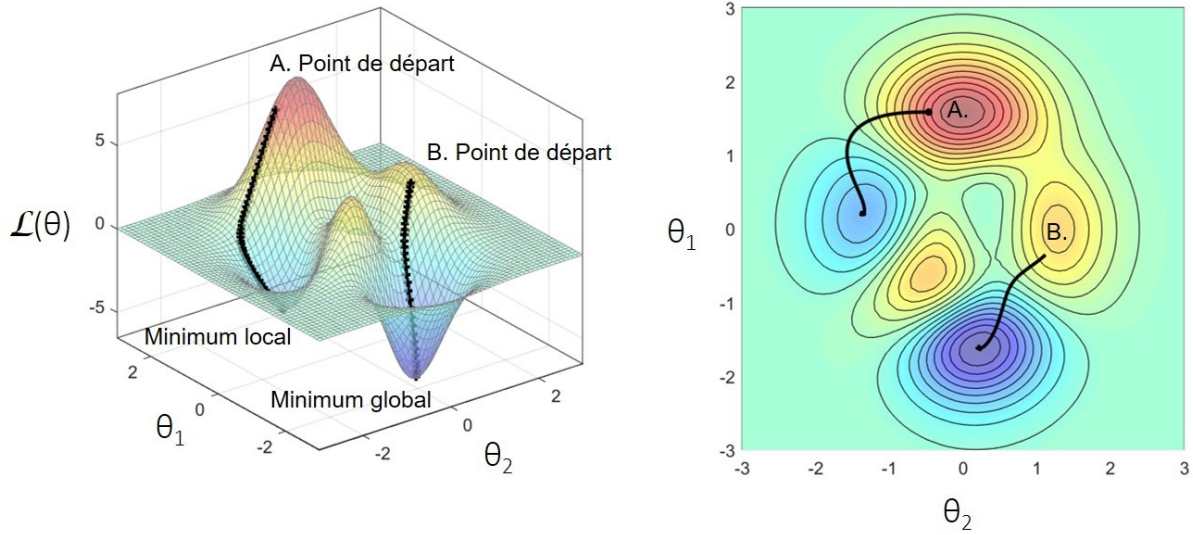


Figure 1.10 Représentation de la surface vallonnée de la fonction de perte $\mathcal{L}(\theta)$ dans l'espace de haute dimension des poids. Les poids sont initiés par des valeurs aléatoires, où leur combinaison résulte en l'erreur calculée aux points A et B. Le gradient (∇) est ensuite calculé en ce point, indiquant la direction d'un maximum local. En utilisant l'inverse du gradient ($-\nabla$), il est possible de trouver la direction ayant la pente la plus abrupte, et donc la direction la plus rapide vers le minimum local. Le vecteur poids est ajusté et l'erreur est à recalculer. Le calcul du gradient est répété, schématisé par les « + » dans la courbe de gauche, jusqu'à l'atteinte du minimum local. Ce point de minimum correspond aux différents couples $\theta_j = \{\mathbf{W}, \mathbf{b}\}$ optimaux pour les j couches du réseau, l'erreur sur la prédiction faite par le réseau est en moyenne plus petite. La méthode de descente du gradient permet uniquement de trouver un minimum local puisque les poids du réseau sont initiés par des valeurs aléatoires. Ce faisant, le minimum trouvé par la descente du gradient peut ne pas être le minimum absolu de la fonction de perte (e.g. A. vs B.).

La descente stochastique du gradient (SGD) est une méthode d'optimisation plus efficace que la GD conventionnelle permettant de trouver plus rapidement le paramètre θ minimisant la fonction de perte. Cette dernière consiste à présenter différentes entrées sous forme de groupe (e.g. 100 spectres Raman à la fois) au réseau lors de l'entraînement, effectuer les prédictions, évaluer l'erreur et calculer le gradient moyen sur ce groupe. Les poids sont ensuite ajustés en se basant sur l'erreur calculée sur le groupe. Le processus est répété sur un

grand nombre de groupes différents jusqu'à ce que l'erreur moyenne de la fonction d'optimisation cesse de diminuer¹¹⁴. Le terme stochastique provient du fait que l'utilisation de plusieurs petits groupes permet l'obtention d'une bonne estimation du gradient total, qui autrement, doit être calculé à chaque itération, augmentant ainsi significativement la demande computationnelle. La SGD permet de rapidement trouver la bonne combinaison de poids afin de minimiser l'erreur en comparaison avec d'autres méthodes d'optimisation plus élaborées et complexes¹³⁴.

1.6.4. Rétro-propagation

Pour ajuster ses poids, le réseau neuronal utilise la rétro-propagation (*backpropagation*), correspondant simplement à l'application de la règle de la dérivation en chaîne (*chain rule*). Dans un réseau neuronal où l'information ne se propage que dans une seule direction (*feed-forward*), vers un niveau d'abstraction toujours de plus en plus important, il est possible d'optimiser le réseau par rétro-propagation (Fig. 1.11). La rétro-propagation est appliquée de manière répétée afin de propager le gradient originaire de la couche de sortie, jusqu'à la couche d'entrée afin de modifier ces poids et minimiser l'erreur sur ces prédictions¹¹⁴.

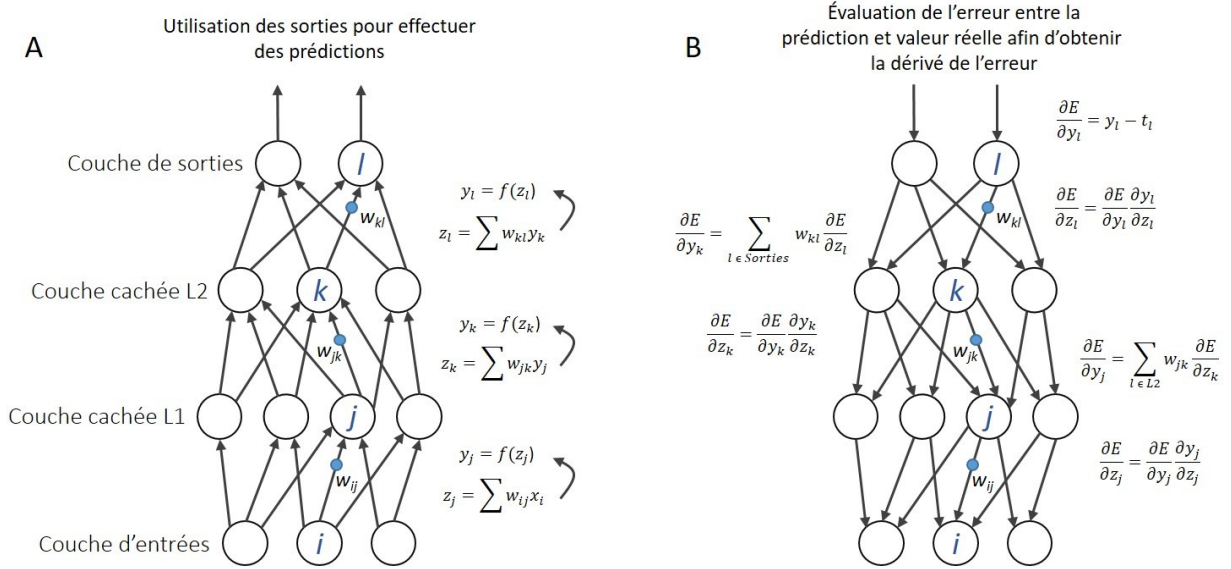


Figure 1.11 (A) Présentation d'un réseau à propagation vers l'avant (*feed forward*), où à chaque couche, les entrées x_i sont pondérées à l'aide de poids w_{ij} et sommées. Ensuite, une fonction non linéaire f est appliquée à z_j afin d'obtenir la sortie y_j des différents neurones des couches. Pour ce type de réseau neuronal, l'information ne se déplace que dans une seule direction, vers un niveau d'abstraction toujours plus important. (B) Présentation des équations permettant la rétro-propagation. Pour chaque couche neuronale, la dérivée d'erreur par rapport à la sortie de chaque neurone est calculée ($\partial E / \partial y_k$). Cette dérivée d'erreur correspond en fait à la somme pondérée des dérivées d'erreur des différentes entrées (z_l) du neurone provenant de la couche supérieure. Nous convertissons ensuite la dérivée d'erreur par rapport à la sortie en dérivée d'erreur par rapport aux entrées en multipliant cette erreur par le gradient $\partial y_k / \partial z_k$. À la couche de sortie du réseau, la dérivée de l'erreur est obtenue en dérivant la fonction de perte $\mathcal{L}(\theta)$. Typiquement, la fonction de perte correspond à l'erreur moyenne au carré correspondant à $0.5(y_l - t_l)^2$, où y_l correspond à la valeur prédite par le réseau et t_l à la vraie valeur. La dérivée de cette fonction de perte est donc $y_l - t_l$.

1.6.5. Réseau neuronal de convolution

Outre les DNN de type *feedforward* conventionnel, un nouveau type d'architecture de réseaux profonds, basé sur le principe biologique de transmission et d'analyse des images

perçues par le cortex visuel du cerveau, fut développé : les réseaux neuronaux de convolution (CNN ou ConvNet)^{129, 135}. Comme dans le cortex visuel du cerveau, Net) l'information locale d'une image est capturée par plusieurs sous-groupes de neurones, où chaque groupe est uniquement sensible à une zone spécifique et différente de l'image capturée. L'information locale capturée par un groupe de neurones est ensuite transmise à un nombre restreint de neurones (Fig.1.12a). Dans un CNN, les neurones composant une couche de convolution sont uniquement reliés à un sous-ensemble de neurones de la couche précédente (Fig.1.12b), où la sortie de taille 3x3 n'est reliée qu'à l'entrée de taille 5x5. L'opération de convolution induit généralement une réduction de dimension. Cette particularité des CNN a pour conséquence de faciliter leur entraînement et permettre de meilleures généralisations du réseau que les DNN conventionnels.

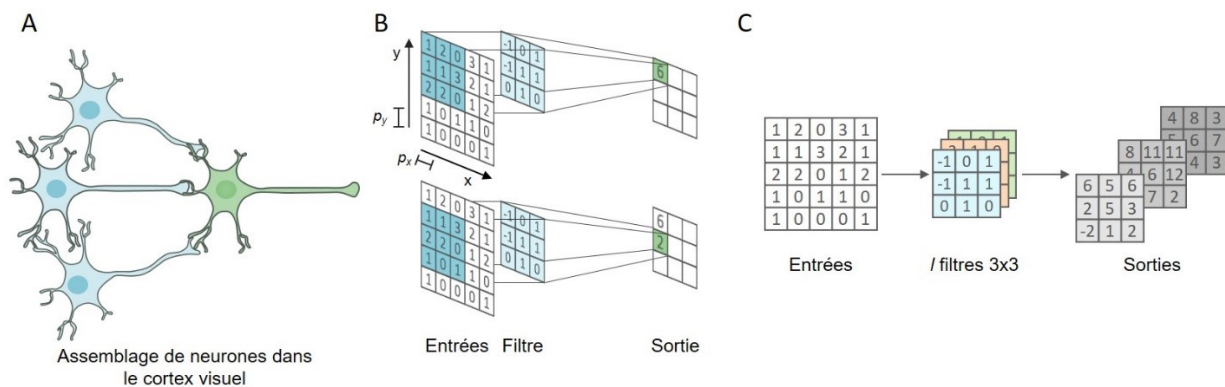


Figure 1.12 (A) Représentation biologique de neurones dans le cortex visuel où la transmission d'information s'effectue entre différents groupes discrets de neurones vers des groupes de plus petites tailles entre chaque connexion, justifiant la transmission d'information hautement pertinente. (B) Représentation d'une couche de convolution, où un filtre de poids est appliqué à une matrice d'entrées. Le filtre est partagé permis toutes les entrées de la matrice. Ce dernier est ensuite déplacé d'un pas p_x et p_y (e.g. 1). Les entrées sont multipliées par le poids correspondant et sommées afin de générer leur sortie respective. L'application d'une convolution induit une réduction de la taille de la matrice d'entrées. Par souci de clarté, la matrice de biais est omise (C) Schématisation de l'utilisation de plusieurs filtres de poids différents (e.g. 3) par une couche de convolution.

Typiquement, une image réelle présente des caractéristiques relativement localisées. Par exemple, une forme géométrique est composée de lignes connectées ensemble afin de former des coins. Dans le cas d'un spectre Raman, les fréquences de vibration de la molécule résultent en la génération de bandes discrètes. Ce faisant, il est possible de diminuer le nombre de paramètres d'apprentissage en introduisant une certaine connectivité locale entre les pixels d'un même voisinage (e.g. les pixels voisins au maximum d'une bande Raman seront aussi plus intenses que la ligne de base). Dans une couche de convolution, un filtre de poids, de taille $m \times n$, est partagé avec toutes les entrées. Cet avantage permet de réduire le nombre de paramètres d'apprentissage du réseau. Il est possible d'appliquer plusieurs filtres de poids l pour les mêmes entrées (Fig.1.12c), permettant l'extraction de plusieurs caractéristiques différentes. L'opération de convolution peut être représentée (Éq 1.4) comme étant la sommation entre l'entrée $x_{m,n}$ pondérée par le poids m,n du filtre l résultant en l sorties h_l de taille $m \times n$.

$$h_{l,m,n} = \sum_{m,n=1} w_l x_{m,n} + b_l \quad (\text{Éq. 1.4})$$

1.6.6. Couche de correction

De manière analogue au perceptron, où les entrées pondérées sont sommées puis transférées à une fonction non-linéaire¹³⁶⁻¹³⁷, les sorties d'une couche de convolution sont transférées à une couche de correction. Cette couche de correction applique essentiellement une fonction d'activation à chaque élément de manière individuelle. La dimension des données est donc inchangée suite à la couche de correction. Les fonctions non linéaires typiques sont la sigmoïde, l'unité de rectification linéaire (ReLU)¹³⁸, l'unité de rectification linéaire paramétrique (Leaky ReLU)¹³⁹ ainsi que l'unité exponentielle linéaire (ELU)¹⁴⁰ (Fig.1.13). La fonction d'activation ReLU est typiquement la plus utilisée, puisqu'elle permet l'apprentissage rapide des réseaux neuronaux profonds¹⁴¹.

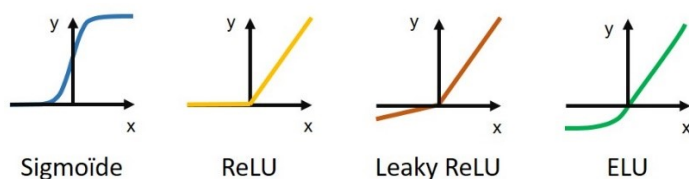


Figure 1.13 Représentation des différentes fonctions d'activation employées par les couches de correction d'un réseau de convolution.

1.6.7. Couche de sous-échantillonnage

Conjointement aux couches de convolution, une couche de sous-échantillonnage est généralement utilisée. Typiquement, une couche dite, *Max pooling*, est utilisée afin d'extraire uniquement la valeur maximum pour un groupe de pixel $m \times n$ (Fig.1.14). L'application de ce type de couche de sous-échantillonnage permet de réduire substantiellement la quantité d'information, en ne conservant que la valeur la plus haute (*max pooling*) ou moyenne (*Average pooling*) au sein d'un voisinage. L'utilisation d'une couche de sous-échantillonnage permet de minimiser la variance translationnelle. Dans le cas de spectres Raman, le sous-échantillonnage permet de minimiser l'impact du changement de fréquence de la bande, problème fréquent en SERS, où la fréquence ainsi que la largeur de bande de vibration peuvent varier de manière importante dans le temps pour une même molécule due à l'adsorption à la surface du capteur plasmonique¹⁴²⁻¹⁴³.

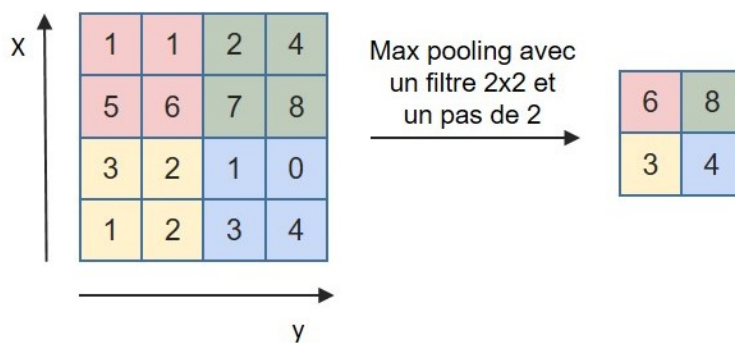


Figure 1.14 Opération de sous-échantillonnage par *max pooling* servant à déterminer la valeur maximale au sein des pixels composant un filtre de taille défini (e.g. 2 x 2). Le filtre est ensuite déplacé d'un pas (e.g. 2) en x et en y. La matrice résultante est significativement plus petite, transférant uniquement la valeur maximale du filtre appliqué de la couche précédente.

1.6.8. Mécanisme de régularisation des réseaux neuronaux

Les DNN contiennent généralement un grand nombre de couches non linéaires cachées. Par conséquent, ces réseaux sont aptes à apprendre et à déterminer des relations extrêmement complexes entre les entrées et les sorties. Ce comportement peut facilement mener au surapprentissage (*overfitting*) du réseau. Le surapprentissage implique que le réseau trouve des liens qui n'existent pas entre les diverses entrées et sorties, ou encore, que le réseau apprend « par cœur » l'identité des données utilisées lors de la phase d'entraînement. Ceci peut être visualisé à l'aide des courbes de pertes du réseau sur (1) les données d'entraînement et (2) les données test qui n'ont jamais été présentées au réseau (Fig.1.15). Dans un cas de surapprentissage, l'erreur sur les données d'entraînement sera faible tandis qu'elle sera élevée pour les données test. À la figure 1.15, il est possible d'observer qu'avant un certain nombre d'itérations (i.e. cycle d'optimisation des poids et biais), l'erreur sur les données d'évaluation est faible. Il est donc possible d'arrêter prématurément l'entraînement du réseau. À ce moment, le modèle permet de généraliser les particularités des données d'entraînement et d'effectuer, avec une bonne exactitude, des prédictions sur des nouvelles données réelles. Cet arrêt précoce, communément appelé arrêt prématuré (*early stopping*), est une méthode conventionnelle pour minimiser le risque de surapprentissage.

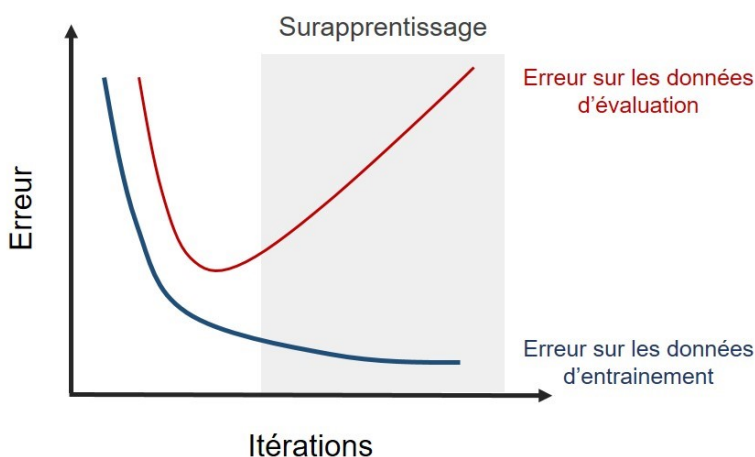


Figure 1.15 Courbes de pertes sur les données d'entraînement et d'évaluation démontrant le surapprentissage du réseau lors de l'entraînement.

Outre l'arrêt prématuré de l'entraînement, il est aussi possible de « désactiver » aléatoirement différents neurones dans les diverses couches neuronales (Fig. 1.16). Le *dropout*¹⁴⁴ permet de s'assurer que le modèle ne dépend pas exclusivement de neurones spécifiques pour effectuer ces généralisations. Cette méthode de régularisation est de loin la méthode la plus utilisée afin de prévenir le surapprentissage.

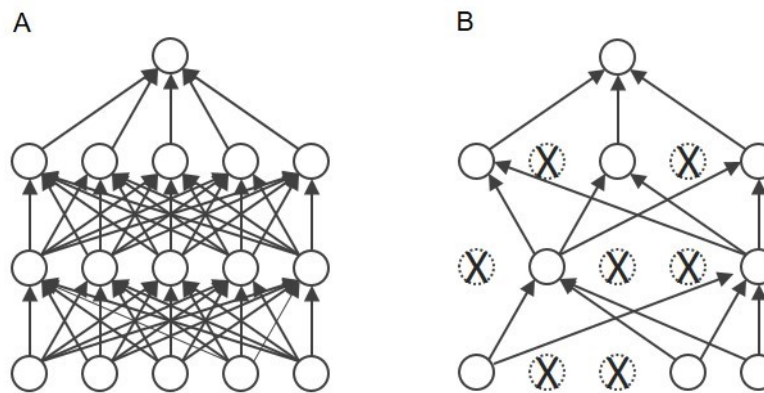


Figure 1.16 (A) Réseau neuronal standard, où aucun mécanisme de régularisation n'est appliqué. (B) Réseau neuronal où le *dropout* est appliqué comme mécanisme de régularisation lors de l'apprentissage servant à minimiser le surapprentissage.

En utilisant une combinaison de différentes couches neuronales, il est possible de créer des réseaux complexes ayant la capacité de catégoriser des données en apprenant et généralisant des relations entre les données d'entrée et les données de sortie. La combinaison de ces couches a permis la génération de plusieurs DNN appliqués à différentes sphères du domaine clinique^{130, 145-149}. Typiquement, un CNN sera composé d'une couche de convolution, d'une couche de correction (e.g. Leaky ReLu), d'une couche de régularisation (e.g. *dropout*) suivie d'une couche de sous-échantillonnage (e.g. *Max Pooling*). Cette unité de 4 couches peut ensuite être répétée plusieurs fois, tout dépendant de la complexité du problème. Classiquement, cette unité est répétée une fois, puis jointe à deux couches d'ANN conventionnelles et une couche de sortie (*softmax*) transformant le résultat en probabilité (Fig. 1.17). LeNet-5¹²⁹, CNN développé pour la reconnaissance de chiffres manuscrits, possède la même architecture, pouvant catégoriser jusqu'à 10 classes différentes. Récemment, différentes architectures plus complexes furent

développées, comme AlexNet, CNN capable de catégoriser 1000 classes d'objets distincts¹⁵⁰. L'utilisation et l'application de ces architectures pour l'analyse de spectres SERS serait donc prometteur et permettrait de catégoriser un grand nombre de métabolites d'intérêt biologique et clinique, tels les neurotransmetteurs permettant l'obtention d'un portrait global des mécanismes biologiques.

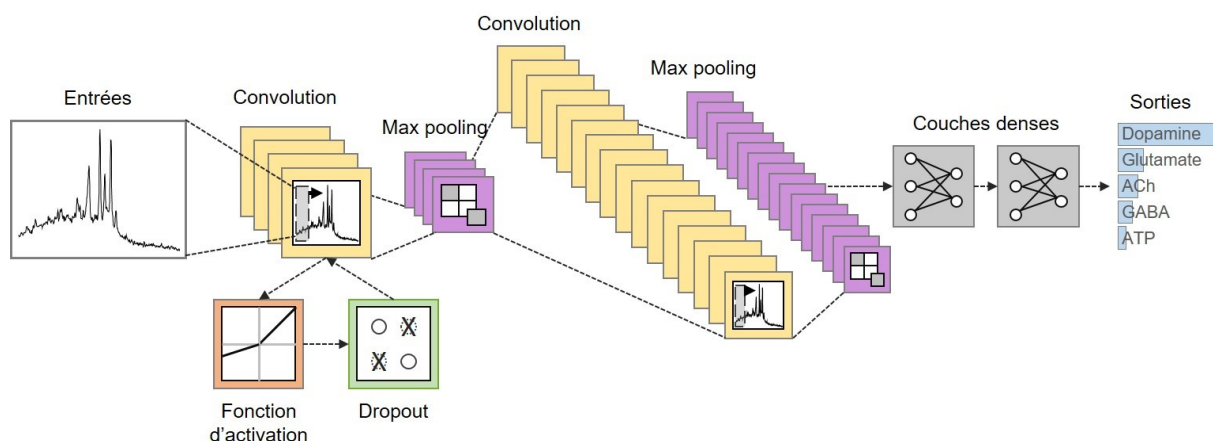


Figure 1.17 Architecture du réseau neuronal de convolution, basé sur l'architecture LeNet-5¹²⁹, adaptée à la reconnaissance de spectre Raman de messagers chimiques (e.g. neurotransmetteurs). Les entrées sont présentées à la première couche de convolution composée de 4 filtres différents. Les résultats sont individuellement transférés à la fonction d'activation (Leaky ReLu). Une couche de régularisation (*dropout*) est ajoutée, puis le sous-échantillonnage est appliqué en utilisant la valeur maximale (*max pooling*) d'un filtre $m \times n$. Les résultats sont ensuite introduits dans une deuxième couche de convolution composée de 16 filtres, incluant la fonction d'activation et le *dropout*. Les filtres sont ensuite individuellement sous-échantillonnés à nouveau. Les résultats sont transférés consécutivement à deux couches neuronales denses, puis les sorties sont transformées en probabilité, une pour chaque classe de molécules pour lesquelles le modèle fut préalablement entraîné. Le spectre Raman présenté initialement au réseau neuronal sera associé à la molécule ayant la plus haute probabilité, permettant son identification.

1.7. Optophysiology SERS

Afin de faciliter la translation d'une nouvelle méthodologie d'analyse de l'environnement cellulaire dans les domaines cliniques et biologiques ou en neuroscience, la nouvelle méthode devrait utiliser des infrastructures similaires à celles déjà bien établies dans les divers domaines scientifiques. Typiquement, les méthodes électrochimiques basées sur l'ampérométrie, la voltamétrie et l'électrophysiologie sont celles les plus fréquemment utilisées pour l'analyse de métabolites sécrétées directement, ou indirectement par des cellules cardiaques, musculaires ou neuronales¹⁵¹. L'ampérométrie et la voltamétrie requièrent un analyte électroactif, limitant leur utilisation. Quant à l'électrophysiologie, utilisant typiquement des électrodes de type *patch clamp*, est la méthode standard utilisée pour l'analyse de canaux ioniques permettant de mesurer en temps réel le courant ionique transigeant par la membrane cellulaire¹⁵². Cette méthode est donc largement utilisée pour la détection du GABA en neuroscience et de métabolites employant des canaux calcique, potassique et sodique comme mécanisme de libération. Cependant, l'électrophysiologie ne permet que la détection indirecte de métabolites, en plus d'être exclusive aux métabolites sécrétés par les canaux ioniques. Ces méthodes ne sont donc pas actuellement adéquates pour permettre la détection d'une vaste gamme de métabolites extracellulaire simultanément. De manière alternative, il serait possible de modifier chimiquement les électrodes utilisées en neurosciences et sciences biologiques afin d'adapter et d'accroître leur performance de détection, facilitant ainsi leur introduction et utilisation par la communauté scientifique.

En positionnant un capteur plasmonique généré à partir d'une *patch clamp* près de cellules, les différents métabolites sécrétés dans l'environnement extracellulaire par des cellules diffuseront dans le milieu et se retrouveront, ultimement, en proximité de la sonde plasmonique. Ces métabolites verront alors leur diffusion Raman exaltée. En effectuant l'acquisition de spectres Raman dans le temps, une variation dynamique de l'intensité et des patrons vibrationnels sera observée en raison des différentes molécules transitant et s'adsorbant momentanément sur la sonde. Si le, ou les métabolites s'adsorbent suffisamment longtemps afin de permettre une détection avec un bon rapport signal sur bruit (SNR)¹⁵³, les métabolites pourront être identifiés par leur patron vibrationnel. De manière analogue à la spectrométrie de masse, l'identification des composés peut être accomplie en comparant les patrons vibrationnels

détectés à ceux d'une base de données générée avant, ou après l'acquisition des spectres expérimentaux

En SERS, le patron vibrationnel observé dépend de l'orientation de la molécule par rapport au champ électrique de la sonde plasmonique. Selon l'orientation de la molécule par rapport au champ électrique de la nanostructure, les modes de vibration moléculaire se retrouvant orientés parallèlement au champ électrique du plasmon se verront davantage exaltés tandis qu'une vibration moléculaire se trouvant perpendiculaire à ce même champ ne bénéficiera d'aucune amplification¹⁵⁴. Par conséquent, une variation temporelle supplémentaire du patron vibrationnel sera observée pour une seule molécule. En plus de cette variation d'intensité des bandes Raman, l'utilisation du SERS est aussi accompagné d'artéfacts correspondant à : (1) une variation de la fréquence de la vibration¹⁴³ et (2) l'apparition/disparition instantanée du patron vibrationnel (*blinking*)¹⁵⁵. Ces phénomènes physico-chimiques doivent donc être pris en compte lors du développement d'une nouvelle méthode analytique dédié à l'analyse de l'environnement extracellulaire.

Patel *et al.* ont proposé l'utilisation de code-barres, extraits de spectres SERS moyens, pour distinguer différentes bactéries par SERS¹¹² tout en minimisant l'impact des artéfacts optiques associés au SERS. L'utilisation de code-barres pourrait donc être adaptée pour permettre la ségrégation de métabolites en fonction de leur code-barres, puis leur identification en comparant les code-barres expérimentaux à ceux d'une librairie externe. Il serait possible d'ajouter une contrainte de certitude dans cette opération de triage, c'est-à-dire, les code-barres doivent être très similaires (Fig. 1.18).

Expérimentalement, des spectres Raman seront acquis sur une période de temps T puis un code-barres sera directement extrait à partir de chaque spectre SERS. Les spectres SERS ayant un SNR adéquat correspondent à des événements moléculaires. Chaque code-barres est ensuite comparé, de manière séquentielle, aux différents standards de la librairie externe. Le temps t , auquel l'évènement moléculaire se produit, est aussi encodé dans le spectre afin de permettre la classification temporelle des événements moléculaires. En effectuant le décompte des événements pour chaque standard sur la période T , il est possible d'évaluer, de manière semi-quantitative, la concentration locale des différents métabolites sondés par le capteur SERS (Fig. 1.18).

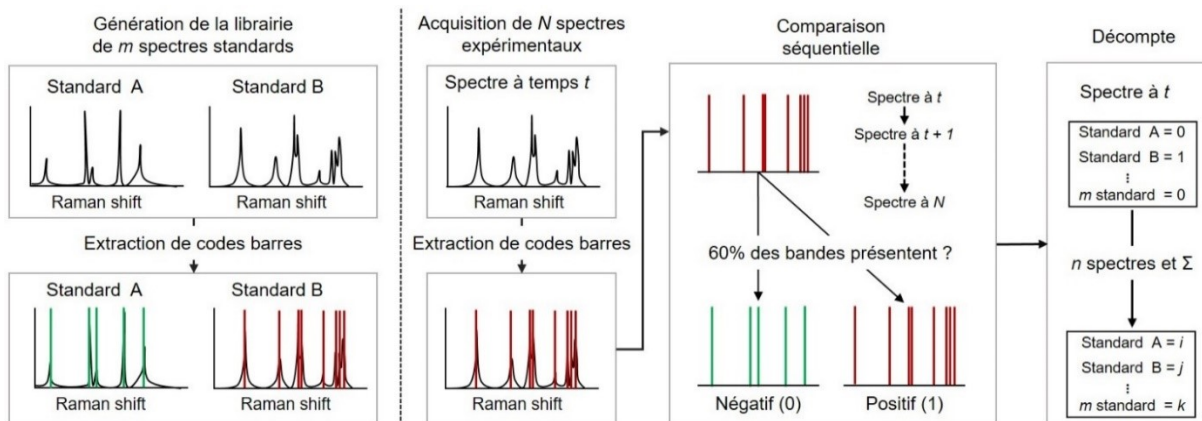


Figure 1.18 Présentation générale du traitement chimométrique effectué dans l'optophysologie SERS.

L'obtention de l'identité des métabolites dans le temps pour chaque évènement moléculaire permet la génération de courbes cinétiques individuelles pour chaque métabolite suivi. Dû à l'allure des courbes, la méthode fut nommée optophysologie SERS, dû à sa grande similitude aux courbes d'électrophysiologie (Fig. 1.19)¹⁵⁶. Dans une courbe d'optophysologie, les barres verticales correspondent aux évènements positifs associés au métabolite correspondant. La somme de ces évènements, sur une période de temps t , de la cinétique est utilisée afin d'évaluer les changements relatifs des concentrations des métabolites dans différentes conditions (e.g. avant et après stimulation).

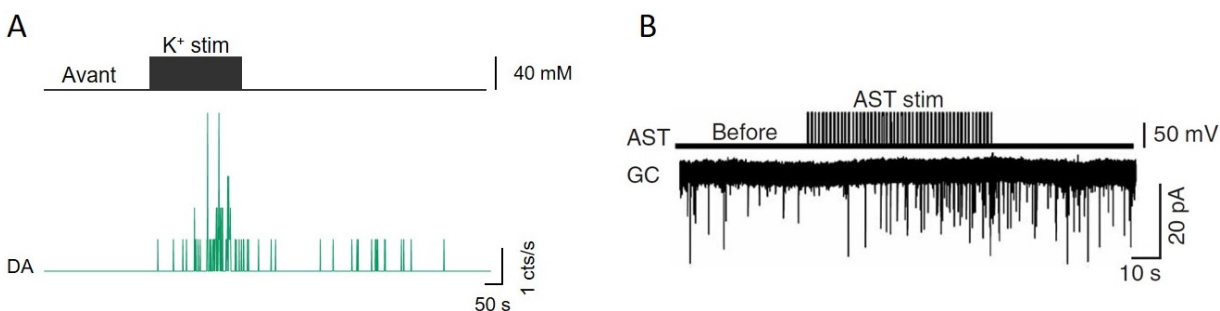


Figure 1.19 Comparaison de la réponse instrumentale mesurée typique en optophysiology SERS et en électrophysiologie. **(A)** Courbe d’optophysiology de la dopamine près des neurones dopaminergiques provenant de la région du mésencéphale de souris. Les barres verticales correspondent aux événements positifs pour la dopamine (DA). La libération de DA est stimulée par l’utilisation de tampon KCl 40 mM. **(B)** Courbe d’électrophysiologie du glutamate de cellules granulaires (GC) avant et durant une stimulation électrique des astrocytes (AST). Adaptée et traduite avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Springer Nature, Nature Neuroscience, référence 157 © 2016

Afin de promouvoir et faciliter l’utilisation de l’optophysiology SERS, la construction du capteur SERS devrait utiliser des infrastructures conventionnelles et déjà bien implémentées dans le domaine. Ainsi, la conception de capteurs plasmoniques à partir de *patch clamp*, telle qu’utilisée en électrophysiologie, sera donc un excellent point de départ. En plus de permettre de positionner précisément le capteur près de cellules, l’adsorption de nanoparticules sur une surface courbe, telle une *patch clamp*, permettrait d’accroître la sensibilité en SERS (Fig. 1.18)¹⁵⁷.

Hu *et al.* ont démontré que l’utilisation de nanofibres comme substrat SERS permet d’accroître l’intensité du champ électrique en confinant les faisceaux laser dû à un effet de lentille induit par la nanofibre. Plutôt qu’utiliser des nanofibres, les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués sur des capillaires de verres nanométrique afin de s’approcher davantage d’une *patch clamp*, en plus d’utiliser des nanoframboises d’or d’environ 70 nm de diamètre plutôt que des nanosphères d’or.

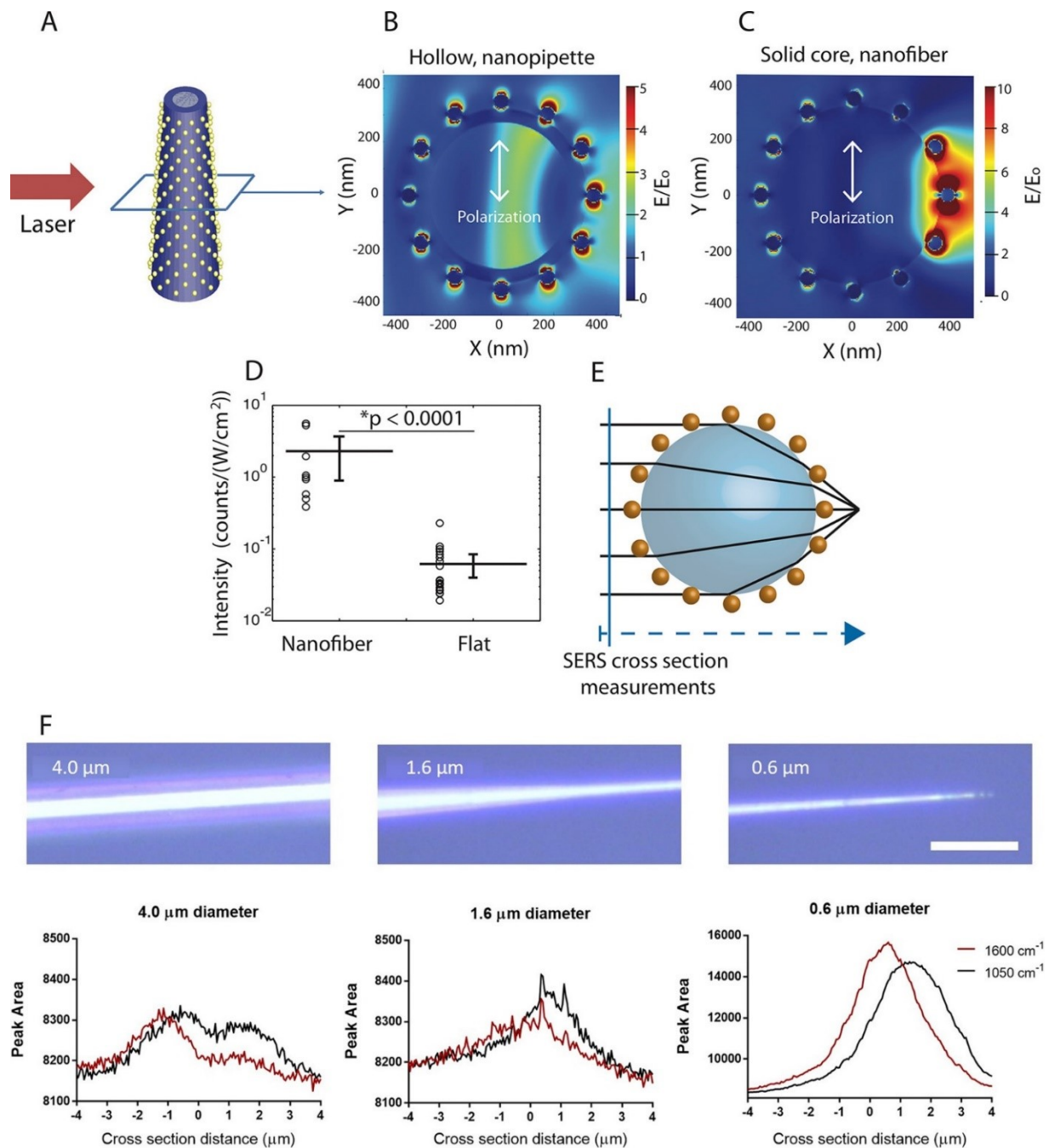


Figure 1.20 Performance SERS de nanofibres décorées de nanosphères d'or adsorbées sur un copolymère bloc. (A) Schéma présentant la méthodologie utilisée pour la simulation d'éléments finis (FEM). Un faisceau polarisé monochromatique de 633 nm se propage de manière perpendiculaire à la surface de la nanofibre. La polarisation du faisceau est parallèle à l'axe y présenté en B et C. Des nanosphères d'or de 52 nm de diamètre furent ordonnées selon un empilement hexagonal présentant une distance de 70 nm entre nanosphères voisines. La

simulation fut effectuée à pour une nanofibre de 650 nm de diamètre. (B) Intensité normalisé du champ électrique d'une nanopipette de type *patch clamp* et (C) d'une nanofibre. (D) Intensité SERS à 1050 cm^{-1} de l'acide 4-mercaptobenzoïque sur une nanofibre ($n = 10$) comparé à l'aide d'un test t pairé sur une surface plane de silicium ($n = 20$). (E) Schéma montrant la convergence de faisceaux induite par une lentille de 650 nm de diamètre (condition en C) à une distance focale située à 156 nm de la surface de la lentille. Cet effet a pour conséquence de concentrer les faisceaux sur un nombre restreint de nanosphères et ainsi augmenter l'intensité du champ électrique. (F) Intensité SERS des bandes à 1050 et 1600 cm^{-1} mesurée sur différentes sections transversales de nanofibres. Adapté avec la permission de de la référence 153. © 2019 American Chemical Society.

1.8. Objectifs de la thèse

Le but principal de ce travail doctoral est d'effectuer la conception de nouvelles technologies permettant l'analyse des métabolites sécrétés par des cellules ainsi que leurs applications pour sonder l'environnement de différentes lignées cellulaires. En comparant les méthodes analytiques contemporaines, on constate qu'aucune méthode n'est parfaitement adaptée à l'analyse des molécules libérées par des cellules. La méthode idéale doit permettre : une haute résolution temporelle, une haute sensibilité afin de capturer les changements rapides de faible concentration associés aux événements de sécrétion cellulaire, une capacité de multiplexage afin de suivre plusieurs molécules simultanément, être non destructive et finalement permettre une analyse localisée avec une bonne résolution spatiale. Ces spécifications analytiques correspondent donc aux caractéristiques essentielles du capteur plasmonique, permettant l'élaboration des objectifs de la thèse (Fig.1.21).

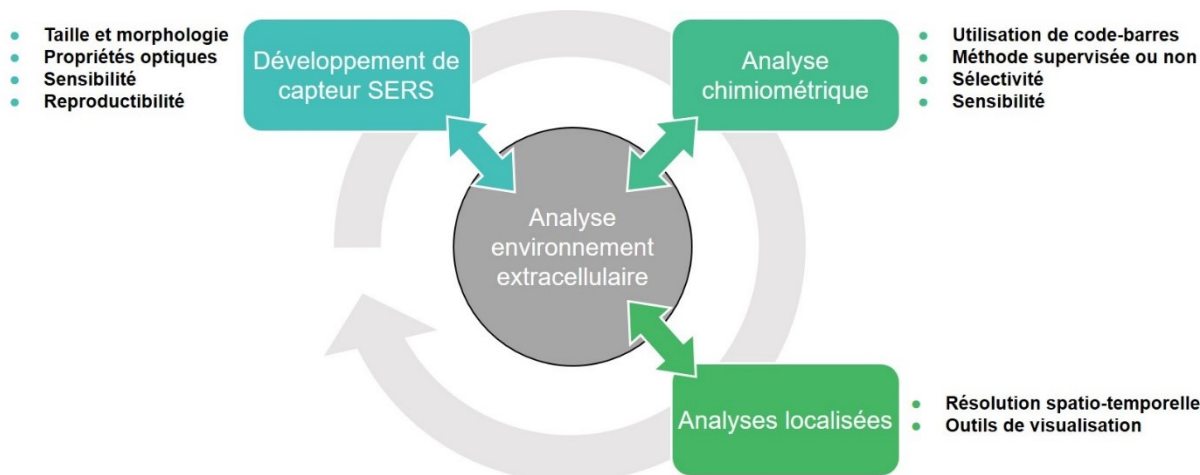


Figure 1.21 Schéma montrant les diverses relations entre les objectifs de la thèse visant au développement de l’optophysologie SERS, nouvelle technologie permettant l’analyse de l’environnement extracellulaire.

Le premier objectif correspond à la conception du capteur plasmonique, l’optimisation de la méthode de préparation et l’évaluation des propriétés optiques. Les capteurs les plus prometteurs sont ensuite appliqués à l’étude de sécrétions cellulaires d’un modèle cellulaire simple : les cellules MDCKII. Pour débiter, les efforts seront concentrés envers quatre métabolites abondants (pyruvate, lactate, ATP et urée) dans l’environnement cellulaire. Ces derniers seront détectés au niveau basal, puis en stimulant la sécrétion cellulaire à l’aide d’un surfactant. Le surfactant induit la formation de pores dans la membrane cellulaire, assurant la libération du contenu intracellulaire qui sera ultimement détecté par le capteur plasmonique. Conjointement à la conception de la sonde plasmonique, une méthode chimiométrique sera développée afin d’analyser la réponse optique des capteurs. Les conclusions tirées de ces expériences vont ensuite servir de nouvelles bases aux prochains objectifs visant à adapter et améliorer les analyses chimiométriques et d’améliorer les performances analytiques de l’optophysologie

Le second objectif consiste aussi à évaluer les capacités d’analytique de l’optophysologie dans des modèles biologiques présentant une complexité un intérêt biologique plus grand. L’exemple choisi correspond aux neurones, puisque les neurones sécrètent des messagers chimiques de manière spontanée dans des conditions basales et peuvent facilement

être stimulés. Ces cellules serviront aussi à la conception d'un nouveau microscope optique multicanaux permettant de visualiser les échantillons biologiques et de correctement positionner les sondes plasmoniques avec une haute résolution spatiale. Ces outils s'avèrent essentiels à l'atteinte du deuxième et troisième objectif afin de mesurer l'hétérogénéité locale des échantillons biologiques dans des zones d'intérêts.

Finalement, le troisième objectif de la thèse consiste à démontrer le potentiel de l'optophysiologie SERS à distinguer les changements locaux d'environnement cellulaire en fonction du phénotype exprimé par différentes lignées cellulaires. Ces expériences vont montrer que la sélectivité et la capacité de multiplexage sont des caractéristiques analytiques essentielles pour permettre l'obtention d'un portrait global du métabolisme cellulaire. Un nouvel algorithme de traitement de données, basé sur de l'intelligence artificielle, sera implémenté à l'optophysiologie SERS. Cet objectif complémentaire permettra de faciliter l'adaptation de l'optophysiologie SERS pour la détection sélective de nouvelles cibles moléculaires, d'améliorer la précision de l'identification moléculaire tout en diminuant le nombre de faux-positifs en plus de permettre éventuellement l'optophysiologie quantitative. Cet objectif clé permettra ultimement la translation de l'optophysiologie vers le domaine médical en tant que méthode d'analyse robuste et fiable.

1.9. Contenu de la thèse

Cette thèse est composée de cinq chapitres, dont les chapitres 2, 3 et 4 relatent les développements et les avancements de l'optophysiologie SERS, où les recherches présentées à chaque chapitre ont pour objectif de combler les lacunes de l'optophysiologie soulevées au chapitre précédent. Dans le chapitre 2, la conception du nanocapteur SERS et de l'algorithme de traitement des données sont présentés. Ces technologies sont ensuite employées afin d'analyser les sécrétions de cellules épithéliales MDCKII. Les résultats publiés dans le journal *Nano Letters* (Lussier, F., Brulé, T., Vishwakarma, M., Das, T., Spatz, J., P., Masson, J.-F., **2016**, *16* (6), 3866–3871) exposent les fondements de l'optophysiologie SERS, qui seront repris dans les chapitres suivants. L'article montre aussi une première tentative de courbe d'approche démontrant le potentiel du nanocapteur SERS pour effectuer des analyses localisées.

Le chapitre 3 relate les limitations de l'algorithme actuel, limité par l'utilisation d'un nombre fixe de bandes dans les codes-barres. Une amélioration de l'algorithme utilisant un nombre variable de bandes pour chaque molécule d'intérêt, publié dans le journal *Faraday Discussion* (Lussier, F., Brulé, T., Bourque, M.-J., Ducrot, C., Trudeau, L.-E., Masson, J.-F., **2017**, 205, 387-407) fut employée pour sonder cinq neurotransmetteurs libérés par des neurones dopaminergiques, analyse précédemment impossible en une seule mesure avec une telle résolution temporelle. L'article présente aussi la conception d'un microscope multicanaux permettant l'imagerie de fluorescence et la spectroscopie Raman dans un même plan focal, outil essentiel pour positionner les nanocapteurs SERS de manière précise près de neurones génétiquement marqués par un fluorophore.

Le chapitre 4 expose le fait que l'optimisation des code-barres est fastidieuse et lente, ce qui limite le déploiement et l'adaptation de la méthode pour l'analyse de nouvelles cibles moléculaires et de nouveaux modèles biologiques. Pour faciliter l'adaptation du traitement des données, d'en améliorer la sélectivité (minimiser les interférences entre les code-barres) et la sensibilité (nombre de spectres retenus pour l'analyse chimiométrique), un CNN fut implémenté à l'optophysiology. L'article publié dans *ACS Nano* (Lussier, F., Missirlis, D., Spatz, J., P., Masson, J.-F., **2019**, 13(2), 1403-1411) relate l'utilisation d'intelligence artificielle pour l'analyse de spectres SERS en optophysiology. L'utilisation du nanocapteur plasmonique et de l'optophysiology couplée à de l'intelligence artificielle ont permis le suivi simultané de sept métabolites sécrétés par différentes lignées cellulaires. Grâce à cette nouvelle méthode, il fut possible de mesurer les gradients moléculaires associés aux métabolismes du carbone, de l'azote et de l'énergie de cellules cancéreuses et saines.

Le dernier chapitre de la thèse correspond à une conclusion, qui en un premier temps servira à faire un retour global sur les objectifs exposés dans les chapitres de la thèse. Par la suite, différentes perspectives pour l'optophysiology seront exposées. Ces perspectives, présentées sous forme d'axe de recherche, sont basées sur les résultats et observations obtenus lors des travaux de cette thèse. Ces perspectives pourront servir de point de départ pour les futurs avancements de l'optophysiology afin d'exploiter son plein potentiel.

1.10. Références

1. Swaney, K. F.; Huang, C.-H.; Devreotes, P. N., Eukaryotic Chemotaxis: A Network of Signaling Pathways Controls Motility, Directional Sensing, and Polarity. *Annu Rev Biophys* **2010**, *39* (1), 265-289.
2. Wadhams, G. H.; Armitage, J. P., Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2004**, *5*, 1024-1037.
3. Roussos, E. T.; Condeelis, J. S.; Patsialou, A., Chemotaxis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 573-587.
4. Kholodenko, B. N., Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2006**, *7*, 165-176.
5. Schlessinger, J., Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2000**, *103* (2), 211-225.
6. Hunter, T., Signaling—2000 and Beyond. *Cell* **2000**, *100* (1), 113-127.
7. Gregor, T.; Wieschaus, E. F.; McGregor, A. P.; Bialek, W.; Tank, D. W., Stability and Nuclear Dynamics of the Bicoid Morphogen Gradient. *Cell* **2007**, *130* (1), 141-152.
8. Gregor, T.; Tank, D. W.; Wieschaus, E. F.; Bialek, W., Probing the Limits to Positional Information. *Cell* **2007**, *130* (1), 153-164.
9. Lunt, S. Y.; Heiden, M. G. V., Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2011**, *27* (1), 441-464.
10. Rorsman, P., The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* **1997**, *40* (5), 487-495.
11. Lang, J., Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* **1999**, *259* (1-2), 3-17.
12. Maechler, P.; Carobbio, S.; Rubi, B., In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, *38* (5-6), 696-709.
13. Argmann, C.; Auwerx, J., Insulin Secretion: SIRT4 Gets in on the Act. *Cell* **2006**, *126* (5), 837-839.
14. Kahn, S. E.; Hull, R. L.; Utzschneider, K. M., Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **2006**, *444*, 840.

15. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H., Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27* (5), 1047-1053.
16. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66* (2), 137-147.
17. David, W., Functional Consequences of Locus Coeruleus Degeneration in Alzheimers Disease. *Curr Alzheimer Res* **2008**, *5* (3), 342-345.
18. Janezic, S.; Threlfell, S.; Dodson, P. D.; Dowie, M. J.; Taylor, T. N.; Potgieter, D.; Parkkinen, L.; Senior, S. L.; Anwar, S.; Ryan, B.; Deltheil, T.; Kosillo, P.; Cioroch, M.; Wagner, K.; Ansorge, O.; Bannerman, D. M.; Bolam, J. P.; Magill, P. J.; Cragg, S. J.; Wade-Martins, R., Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110* (42), E4016-E4025.
19. Höglinger, G. U.; Rizk, P.; Muriel, M. P.; Duyckaerts, C.; Oertel, W. H.; Caille, I.; Hirsch, E. C., Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 726-735.
20. Jacobsen, J. P. R.; Medvedev, I. O.; Caron, M. G., The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2012**, *367* (1601), 2444-2459.
21. Williams, M. J.; Adinoff, B., The Role of Acetylcholine in Cocaine Addiction. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *33*, 1779-1797.
22. Seeman, P.; Kapur, S., Schizophrenia: More dopamine, more D₂ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97* (14), 7673-7675.
23. Shen, M.; Qu, Z.; DesLaurier, J.; Welle, T. M.; Sweedler, J. V.; Chen, R., Single Synaptic Observation of Cholinergic Neurotransmission on Living Neurons: Concentration and Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (25), 7764-7768.
24. Filice, F. P.; Ding, Z., Analysing single live cells by scanning electrochemical microscopy. *Analyst* **2019**, *144* (3), 738-752.
25. Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaître, F., Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion: Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2585-2621.

26. Jackowska, K.; Krysinski, P., New trends in the electrochemical sensing of dopamine. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (11), 3753-3771.
27. Wei, H.; Shang, T.; Wu, T.; Liu, G.; Ding, L.; Liu, X., Construction of an ultrasensitive non-enzymatic sensor to investigate the dynamic process of superoxide anion release from living cells. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *100*, 8-15.
28. Liu, H. Y.; Weng, L. Y.; Yang, C., A review on nanomaterial-based electrochemical sensors for H₂O₂, H₂S and NO inside cells or released by cells. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (5), 1267-1283.
29. Perry, M.; Li, Q.; Kennedy, R. T., Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *653* (1), 1-22.
30. Ernst, H.; Knoll, M., Electrochemical characterisation of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *449* (1), 129-134.
31. Majewska, U. E.; Chmurski, K.; Biesiada, K.; Olszyna, A. R.; Bilewicz, R., Dopamine Oxidation at Per(6-deoxy-6-thio)- α -Cyclodextrin Monolayer Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis* **2006**, *18* (15), 1463-1470.
32. Zacharis, C. K.; Theodoridis, G. A.; Voulgaropoulos, A. N., On-line coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and determination of gamma-aminobutyric acid in human biological fluids. *J. Chromatogr. B* **2004**, *808* (2), 169-175.
33. Li, S. T.; Yu, Q. L.; Lu, X.; Zhao, S. L., Determination of D,L-serine in midbrain of Parkinson's disease mouse by capillary electrophoresis with in-column light-emitting diode induced fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (2), 282-287.
34. Song, Y.; Shenwu, M.; Dhossche, D. M.; Liu, Y. M., A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of gamma-aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B* **2005**, *814* (2), 295-302.
35. Masujima, T., Live Single-cell Mass Spectrometry. *Anal. Sci.* **2009**, *25* (8), 953-960.
36. Date, S.; Mizuno, H.; Tsuyama, N.; Harada, T.; Masujima, T., Direct Drug Metabolism Monitoring in a Live Single Hepatic Cell by Video Mass Spectrometry. *Anal. Sci.* **2012**, *28* (3), 201-203.

37. Oguri, S.; Nomura, M.; Fujita, Y., Site-specific sampling of taurine from rat brain followed by on-line sample pre-concentration, throughout in-capillary derivatization and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **2006**, *843* (2), 194-201.
38. Bowser, M. T.; Kennedy, R. T., In vivomonitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2001**, *22* (17), 3668-3676.
39. Parrot, S.; Sauvinet, V.; Riban, V.; Depaulis, A.; Renaud, B.; Denoroy, L., High temporal resolution for in vivo monitoring of neurotransmitters in awake epileptic rats using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Neurosci. Methods* **2004**, *140* (1), 29-38.
40. Tian, L.; Hires, S. A.; Mao, T.; Huber, D.; Chiappe, M. E.; Chalasani, S. H.; Petreanu, L.; Akerboom, J.; McKinney, S. A.; Schreiter, E. R.; Bargmann, C. I.; Jayaraman, V.; Svoboda, K.; Looger, L. L., Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 875-881.
41. Wang, Y.; Guo, H.-F.; Pologruto, T. A.; Hannan, F.; Hakker, I.; Svoboda, K.; Zhong, Y., Stereotyped Odor-Evoked Activity in the Mushroom Body of *Drosophila* Revealed by Green Fluorescent Protein-Based Ca^{2+} Imaging. *J. Neurosci.* **2004**, *24* (29), 6507-6514.
42. Kerr, R.; Lev-Ram, V.; Baird, G.; Vincent, P.; Tsien, R. Y.; Schafer, W. R., Optical Imaging of Calcium Transients in Neurons and Pharyngeal Muscle of *C. elegans*. *Neuron* **2000**, *26* (3), 583-594.
43. GIBhardt, C. S.; Vultur, A.; Bogeski, I., Measuring Calcium and ROS by Genetically Encoded Protein Sensors and Fluorescent Dyes. In *Calcium Signalling: Methods and Protocols*, Raffaello, A.; Vecellio Reane, D., Eds. Springer New York: New York, NY, 2019; pp 183-196.
44. Chen, T.-W.; Wardill, T. J.; Sun, Y.; Pulver, S. R.; Renninger, S. L.; Baohan, A.; Schreiter, E. R.; Kerr, R. A.; Orger, M. B.; Jayaraman, V.; Looger, L. L.; Svoboda, K.; Kim, D. S., Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **2013**, *499*, 295.
45. Sahl, S. J.; Hell, S. W.; Jakobs, S., Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2017**, *18*, 685.
46. El Mestikawy, S.; Wallén-Mackenzie, Å.; Fortin, G. M.; Descarries, L.; Trudeau, L.-E., From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 204-216.

47. Ingle, J. D., *Spectrochemical analysis*. Englewood Cliffs, N.J. : Prentice Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1988.
48. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. *J Phys Condens Matter* **2002**, *14* (18), R597-R624.
49. Willets, K. A.; Duyne, R. P. V., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu Rev Phys Chem* **2007**, *58* (1), 267-297.
50. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J.-F., Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15* (27), 11190-11216.
51. Juan, M. L.; Righini, M.; Quidant, R., Plasmon nano-optical tweezers. *Nat. Photonics* **2011**, *5*, 349-356.
52. Raether, H., *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*. Springer-Verlag, Berlin: 1988.
53. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (7), 2740-2779.
54. Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C., The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull* **2007**, *40* (4), 270-277.
55. Chen, P.; Chung, M. T.; McHugh, W.; Nidetz, R.; Li, Y.; Fu, J.; Cornell, T. T.; Shanley, T. P.; Kurabayashi, K., Multiplex Serum Cytokine Immunoassay Using Nanoplasmonic Biosensor Microarrays. *ACS Nano* **2015**, *9* (4), 4173-4181.
56. Schultz, S.; Smith, D. R.; Mock, J. J.; Schultz, D. A., Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97* (3), 996-1001.
57. Nam, J.-M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A., Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins. *Science* **2003**, *301* (5641), 1884-1886.
58. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P., Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2264-2271.
59. Inci, F.; Tokel, O.; Wang, S.; Gurkan, U. A.; Tasoglu, S.; Kuritzkes, D. R.; Demirci, U., Nanoplasmonic Quantitative Detection of Intact Viruses from Unprocessed Whole Blood. *ACS Nano* **2013**, *7* (6), 4733-4745.

60. Yamamichi, J.; Ojima, T.; Yurugi, K.; Iida, M.; Imamura, T.; Ashihara, E.; Kimura, S.; Maekawa, T., Single-step, label-free quantification of antibody in human serum for clinical applications based on localized surface plasmon resonance. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2011**, 7 (6), 889-895.
61. Lee, K. J.; Nallathamby, P. D.; Browning, L. M.; Osgood, C. J.; Xu, X.-H. N., In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ACS Nano* **2007**, 1 (2), 133-143.
62. Sobral-Filho, R. G.; Brito-Silva, A. M.; Isabelle, M.; Jirasek, A.; Lum, J. J.; Brolo, A. G., Plasmonic labeling of subcellular compartments in cancer cells: multiplexing with fine-tuned gold and silver nanoshells. *Chem Sci* **2017**, 8 (4), 3038-3046.
63. Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Duyne, R. P. V., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **2008**, 1 (1), 601-626.
64. Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G., Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (2), 494-521.
65. Schlücker, S., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53 (19), 4756-4795.
66. Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G., Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem* **2012**, 63 (1), 65-87.
67. Nie, S.; Emory, S. R., Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997**, 275 (5303), 1102-1106.
68. Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys Rev Lett* **1997**, 78 (9), 1667-1670.
69. Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P., Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 2006.
70. Yockell-Lelièvre, H.; Lussier, F.; Masson, J. F., Influence of the Particle Shape and Density of Self-Assembled Gold Nanoparticle Sensors on LSPR and SERS. *J Phys Chem C* **2015**, 119 (51), 28577-28585.
71. Blatchford, C. G.; Campbell, J. R.; Creighton, J. A., Plasma resonance — enhanced raman scattering by absorbates on gold colloids: The effects of aggregation. *Surf Sci* **1982**, 120 (2), 435-455.

72. Hao, E.; Schatz, G. C., Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *J Chem Phys* **2004**, *120* (1), 357-366.
73. Aravind, P. K.; Nitzan, A.; Metiu, H., The interaction between electromagnetic resonances and its role in spectroscopic studies of molecules adsorbed on colloidal particles or metal spheres. *Surf Sci* **1981**, *110* (1), 189-204.
74. Aravind, P. K.; Metiu, H., The effects of the interaction between resonances in the electromagnetic response of a sphere-plane structure; applications to surface enhanced spectroscopy. *Surf Sci* **1983**, *124* (2), 506-528.
75. Ding, S.-Y.; You, E.-M.; Tian, Z.-Q.; Moskovits, M., Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem Soc Rev* **2017**, *46* (13), 4042-4076.
76. Banholzer, M. J.; Millstone, J. E.; Qin, L.; Mirkin, C. A., Rationally designed nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem Soc Rev* **2008**, *37* (5), 885-897.
77. Vitol, E. A.; Orynbayeva, Z.; Bouchard, M. J.; Azizkhan-Clifford, J.; Friedman, G.; Gogotsi, Y., In Situ Intracellular Spectroscopy with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)-Enabled Nanopipettes. *ACS Nano* **2009**, *3* (11), 3529-3536.
78. Kazuki, B.; Nicholas, I. S.; Jun, A.; Katsumasa, F.; Satoshi, K., Analysis of dynamic SERS spectra measured with a nanoparticle during intracellular transportation in 3D. *J Opt* **2015**, *17* (11), 114023.
79. Huefner, A.; Kuan, W.-L.; Müller, K. H.; Skepper, J. N.; Barker, R. A.; Mahajan, S., Characterization and Visualization of Vesicles in the Endo-Lysosomal Pathway with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Chemometrics. *ACS Nano* **2016**, *10* (1), 307-316.
80. Lussier, F.; Brulé, T.; Bourque, M.-J.; Ducrot, C.; Trudeau, L.-É.; Masson, J.-F., Dynamic SERS nanosensor for neurotransmitter sensing near neurons. *Faraday Discuss* **2017**, *205* (0), 387-407.
81. Lussier, F.; Brulé, T.; Vishwakarma, M.; Das, T.; Spatz, J. P.; Masson, J.-F., Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events. *Nano Lett.* **2016**, *16* (6), 3866-3871.
82. Chen, Y.; Ding, L.; Song, W.; Yang, M.; Ju, H., Protein-specific Raman imaging of glycosylation on single cells with zone-controllable SERS effect. *Chem Sci* **2016**, *7* (1), 569-574.

83. Kang, B.; Austin, L. A.; El-Sayed, M. A., Observing Real-Time Molecular Event Dynamics of Apoptosis in Living Cancer Cells using Nuclear-Targeted Plasmonically Enhanced Raman Nanoprobes. *ACS Nano* **2014**, 8 (5), 4883-4892.
84. Chen, P.; Wang, Z.; Zong, S.; Chen, H.; Zhu, D.; Zhong, Y.; Cui, Y., A wide range optical pH sensor for living cells using Au@Ag nanoparticles functionalized carbon nanotubes based on SERS signals. *Anal Bioanal Chem* **2014**, 406 (25), 6337-6346.
85. Zheng, X.-S.; Hu, P.; Cui, Y.; Zong, C.; Feng, J.-M.; Wang, X.; Ren, B., BSA-Coated Nanoparticles for Improved SERS-Based Intracellular pH Sensing. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (24), 12250-12257.
86. Cialla-May, D.; Zheng, X. S.; Weber, K.; Popp, J., Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics. *Chem Soc Rev* **2017**, 46 (13), 3945-3961.
87. Gu, X.; Wang, H.; Schultz, Z. D.; Camden, J. P., Sensing Glucose in Urine and Serum and Hydrogen Peroxide in Living Cells by Use of a Novel Boronate Nanoprobe Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (14), 7191-7197.
88. Brazhe, N. A.; Evlyukhin, A. B.; Goodilin, E. A.; Semenova, A. A.; Novikov, S. M.; Bozhevolnyi, S. I.; Chichkov, B. N.; Sarycheva, A. S.; Baizhumanov, A. A.; Nikelshparg, E. I.; Deev, L. I.; Maksimov, E. G.; Maksimov, G. V.; Sosnovtseva, O., Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sci Rep* **2015**, 5, 13793.
89. Cao, Y.; Li, D.-W.; Zhao, L.-J.; Liu, X.-Y.; Cao, X.-M.; Long, Y.-T., Highly Selective Detection of Carbon Monoxide in Living Cells by Palladacycle Carbonylation-Based Surface Enhanced Raman Spectroscopy Nanosensors. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (19), 9696-9701.
90. Cui, J.; Hu, K.; Sun, J.-J.; Qu, L.-L.; Li, D.-W., SERS nanoprobes for the monitoring of endogenous nitric oxide in living cells. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 85, 324-330.
91. Koo, K. M.; Wang, J.; Richards, R. S.; Farrell, A.; Yaxley, J. W.; Samaratunga, H.; Teloken, P. E.; Roberts, M. J.; Coughlin, G. D.; Lavin, M. F.; Mainwaring, P. N.; Wang, Y.; Gardiner, R. A.; Trau, M., Design and Clinical Verification of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Diagnostic Technology for Individual Cancer Risk Prediction. *ACS Nano* **2018**, 12 (8), 8362-8371.
92. Harmsen, S.; Rogalla, S.; Huang, R.; Spaliviero, M.; Neuschmelting, V.; Hayakawa, Y.; Lee, Y.; Tailor, Y.; Toledo-Crow, R.; Kang, J. W.; Samii, J. M.; Karabeber, H.; Davis, R. M.;

- White, J. R.; van de Rijn, M.; Gambhir, S. S.; Contag, C. H.; Wang, T. C.; Kircher, M. F., Detection of Premalignant Gastrointestinal Lesions Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering-Nanoparticle Endoscopy. *ACS Nano* **2019**, *13* (2), 1354-1364.
93. Kim, W.; Lee, S. H.; Kim, J. H.; Ahn, Y. J.; Kim, Y.-H.; Yu, J. S.; Choi, S., Paper-Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Diagnosing Prenatal Diseases in Women. *ACS Nano* **2018**, *12* (7), 7100-7108.
94. Nima, Z. A.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Mustafa, T.; Watanabe, F.; Nedosekin, D. A.; Juratli, M. A.; Fahmi, T.; Galanzha, E. I.; Nolan, J. P.; Basnakian, A. G.; Zharov, V. P.; Biris, A. S., Circulating tumor cell identification by functionalized silver-gold nanorods with multicolor, super-enhanced SERS and photothermal resonances. *Sci Rep* **2014**, *4*, 4752.
95. Wu, X.; Xia, Y.; Huang, Y.; Li, J.; Ruan, H.; Chen, T.; Luo, L.; Shen, Z.; Wu, A., Improved SERS-Active Nanoparticles with Various Shapes for CTC Detection without Enrichment Process with Supersensitivity and High Specificity. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8* (31), 19928-19938.
96. Pallaoro, A.; Hoonejani, M. R.; Braun, G. B.; Meinhart, C. D.; Moskovits, M., Rapid Identification by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Cancer Cells at Low Concentrations Flowing in a Microfluidic Channel. *ACS Nano* **2015**, *9* (4), 4328-4336.
97. Wang, Y.; Kang, S.; Khan, A.; Ruttner, G.; Leigh, S. Y.; Murray, M.; Abeytunge, S.; Peterson, G.; Rajadhyaksha, M.; Dintzis, S.; Javid, S.; Liu, J. T. C., Quantitative molecular phenotyping with topically applied SERS nanoparticles for intraoperative guidance of breast cancer lumpectomy. *Sci Rep* **2016**, *6*, 21242.
98. Girish, C. M.; Iyer, S.; Thankappan, K.; Rani, V. V. D.; Gowd, G. S.; Menon, D.; Nair, S.; Koyakutty, M., Rapid detection of oral cancer using Ag-TiO₂ nanostructured surface-enhanced Raman spectroscopic substrates. *J Mater Chem B* **2014**, *2* (8), 989-998.
99. Zuanfang, L.; Chao, L.; Duo, L.; Zufang, H.; Jianji, P.; Guannan, C.; Juqiang, L.; Nenrong, L.; Yun, Y.; Shangyuan, F.; Rong, C., Surface-enhanced Raman spectroscopy for differentiation between benign and malignant thyroid tissues. *Laser Phys Lett* **2014**, *11* (4), 045602.
100. Jeong, S.; Kim, Y.-i.; Kang, H.; Kim, G.; Cha, M. G.; Chang, H.; Jung, K. O.; Kim, Y.-H.; Jun, B.-H.; Hwang, D. W.; Lee, Y.-S.; Youn, H.; Lee, Y.-S.; Kang, K. W.; Lee, D. S.; Jeong,

D. H., Fluorescence-Raman Dual Modal Endoscopic System for Multiplexed Molecular Diagnostics. *Sci Rep* **2015**, *5*, 9455.

101. Garai, E.; Sensarn, S.; Zavaleta, C. L.; Loewke, N. O.; Rogalla, S.; Mandella, M. J.; Felt, S. A.; Friedland, S.; Liu, J. T. C.; Gambhir, S. S.; Contag, C. H., A Real-Time Clinical Endoscopic System for Intraluminal, Multiplexed Imaging of Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0123185.

102. Mallia, R. J.; McVeigh, P. Z.; Fisher, C. J.; Veilleux, I.; Wilson, B. C., Wide-field multiplexed imaging of EGFR-targeted cancers using topical application of NIR SERS nanoprobes. *Nanomedicine* **2015**, *10* (1), 89-101.

103. Davis, R. M.; Kiss, B.; Trivedi, D. R.; Metzner, T. J.; Liao, J. C.; Gambhir, S. S., Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles for Multiplexed Imaging of Bladder Cancer Tissue Permeability and Molecular Phenotype. *ACS Nano* **2018**, *12* (10), 9669-9679.

104. Simon, T.; Potara, M.; Gabudean, A.-M.; Licarete, E.; Banciu, M.; Astilean, S., Designing Theranostic Agents Based on Pluronic Stabilized Gold Nanoaggregates Loaded with Methylene Blue for Multimodal Cell Imaging and Enhanced Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2015**, *7* (30), 16191-16201.

105. Zhang, W.; Wang, Y.; Sun, X.; Wang, W.; Chen, L., Mesoporous titania based yolk-shell nanoparticles as multifunctional theranostic platforms for SERS imaging and chemophotothermal treatment. *Nanoscale* **2014**, *6* (23), 14514-14522.

106. Hossain, M. K.; Cho, H.-Y.; Kim, K.-J.; Choi, J.-W., In situ monitoring of doxorubicin release from biohybrid nanoparticles modified with antibody and cell-penetrating peptides in breast cancer cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 300-305.

107. Qiu, Y.; Zhang, Y.; Li, M.; Chen, G.; Fan, C.; Cui, K.; Wan, J.-B.; Han, A.; Ye, J.; Xiao, Z., Intraoperative Detection and Eradication of Residual Microtumors with Gap-Enhanced Raman Tags. *ACS Nano* **2018**, *12* (8), 7974-7985.

108. Song, J.; Zhou, J.; Duan, H., Self-Assembled Plasmonic Vesicles of SERS-Encoded Amphiphilic Gold Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Traceable Intracellular Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (32), 13458-13469.

109. Diem, M.; Romeo, M.; Boydston-White, S.; Miljković, M.; Matthäus, C., A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994–2004). *Analyst* **2004**, *129* (10), 880-885.
110. Butler, H. J.; Ashton, L.; Bird, B.; Cinque, G.; Curtis, K.; Dorney, J.; Esmonde-White, K.; Fullwood, N. J.; Gardner, B.; Martin-Hirsch, P. L.; Walsh, M. J.; McAinsh, M. R.; Stone, N.; Martin, F. L., Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 664-687.
111. Kamińska, A.; Witkowska, E.; Kowalska, A.; Skoczyńska, A.; Ronkiewicz, P.; Szymborski, T.; Waluk, J., Rapid detection and identification of bacterial meningitis pathogens in ex vivo clinical samples by SERS method and principal component analysis. *Anal Methods* **2016**, *8* (22), 4521-4529.
112. Patel, I. S.; Premasiri, W. R.; Moir, D. T.; Ziegler, L. D., Barcoding Bacterial Cells: a SERS-Based Methodology for Pathogen Identification. *J Raman Spectrosc* **2008**, *39* (11), 1660-1672.
113. Ellis, D. I.; Goodacre, R., Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst* **2006**, *131* (8), 875-885.
114. LeCun, Y.; Bengio, Y.; Hinton, G., Deep learning. *Nature* **2015**, *521*, 436.
115. Kumar, R.; Sharma, V., Chemometrics in forensic science. *Trends Analyt Chem* **2018**, *105*, 191-201.
116. Raina, R.; Madhavan, A.; Ng, A. Y., Large-scale deep unsupervised learning using graphics processors. In *Proceedings of the 26th Annual International Conference on Machine Learning*, ACM: Montreal, Quebec, Canada, 2009; pp 873-880.
117. Cheng, J.-Z.; Ni, D.; Chou, Y.-H.; Qin, J.; Tiu, C.-M.; Chang, Y.-C.; Huang, C.-S.; Shen, D.; Chen, C.-M., Computer-Aided Diagnosis with Deep Learning Architecture: Applications to Breast Lesions in US Images and Pulmonary Nodules in CT Scans. *Sci Rep* **2016**, *6*, 24454.
118. Esteva, A.; Kuprel, B.; Novoa, R. A.; Ko, J.; Swetter, S. M.; Blau, H. M.; Thrun, S., Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature* **2017**, *542*, 115-118.
119. Kermany, D. S.; Goldbaum, M.; Cai, W.; Valentim, C. C. S.; Liang, H.; Baxter, S. L.; McKeown, A.; Yang, G.; Wu, X.; Yan, F.; Dong, J.; Prasadha, M. K.; Pei, J.; Ting, M. Y. L.; Zhu, J.; Li, C.; Hewett, S.; Dong, J.; Ziyar, I.; Shi, A.; Zhang, R.; Zheng, L.; Hou, R.; Shi, W.;

- Fu, X.; Duan, Y.; Huu, V. A. N.; Wen, C.; Zhang, E. D.; Zhang, C. L.; Li, O.; Wang, X.; Singer, M. A.; Sun, X.; Xu, J.; Tafreshi, A.; Lewis, M. A.; Xia, H.; Zhang, K., Identifying Medical Diagnoses and Treatable Diseases by Image-Based Deep Learning. *Cell* **2018**, *172* (5), 1122-1131.e9.
120. He, K.; Zhang, X.; Ren, S.; Sun, J. In *Deep Residual Learning for Image Recognition*, 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 27-30 June 2016; 2016; pp 770-778.
121. Hinton, G.; Deng, L.; Yu, D.; Dahl, G. E.; Mohamed, A.; Jaitly, N.; Senior, A.; Vanhoucke, V.; Nguyen, P.; Sainath, T. N.; Kingsbury, B., Deep Neural Networks for Acoustic Modeling in Speech Recognition: The Shared Views of Four Research Groups. *IEEE Signal Process Mag* **2012**, *29* (6), 82-97.
122. Ma, J.; Sheridan, R. P.; Liaw, A.; Dahl, G. E.; Svetnik, V., Deep Neural Nets as a Method for Quantitative Structure–Activity Relationships. *J Chem Inf Model* **2015**, *55* (2), 263-274.
123. Xiong, H. Y.; Alipanahi, B.; Lee, L. J.; Bretschneider, H.; Merico, D.; Yuen, R. K. C.; Hua, Y.; Gueroussov, S.; Najafabadi, H. S.; Hughes, T. R.; Morris, Q.; Barash, Y.; Krainer, A. R.; Jojic, N.; Scherer, S. W.; Blencowe, B. J.; Frey, B. J., The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* **2015**, *347* (6218), 1254806.
124. Silver, D.; Huang, A.; Maddison, C. J.; Guez, A.; Sifre, L.; van den Driessche, G.; Schrittwieser, J.; Antonoglou, I.; Panneershelvam, V.; Lanctot, M.; Dieleman, S.; Grewe, D.; Nham, J.; Kalchbrenner, N.; Sutskever, I.; Lillicrap, T.; Leach, M.; Kavukcuoglu, K.; Graepel, T.; Hassabis, D., Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. *Nature* **2016**, *529*, 484-489.
125. Mnih, V.; Kavukcuoglu, K.; Silver, D.; Rusu, A. A.; Veness, J.; Bellemare, M. G.; Graves, A.; Riedmiller, M.; Fidjeland, A. K.; Ostrovski, G.; Petersen, S.; Beattie, C.; Sadik, A.; Antonoglou, I.; King, H.; Kumaran, D.; Wierstra, D.; Legg, S.; Hassabis, D., Human-level control through deep reinforcement learning. *Nature* **2015**, *518*, 529-533.
126. Liu, J.; Osadchy, M.; Ashton, L.; Foster, M.; Solomon, C. J.; Gibson, S. J., Deep convolutional neural networks for Raman spectrum recognition: a unified solution. *Analyst* **2017**, *142* (21), 4067-4074.
127. Shi, H. Y.; Wang, H. Y.; Meng, X. Y.; Chen, R. Z.; Zhang, Y. S.; Su, Y. Y.; He, Y., Setting Up a Surface-Enhanced Raman Scattering Database for Artificial-Intelligence-Based

Label-Free Discrimination of Tumor Suppressor Genes. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (24), 14216-14221.

128. Weng, S.; Xu, X.; Li, J.; Wong, S. T. C., Combining deep learning and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging for automated differential diagnosis of lung cancer. *J Biomed Opt* **2017**, 22 (10), 106017.

129. Lecun, Y.; Bottou, L.; Bengio, Y.; Haffner, P., Gradient-based learning applied to document recognition. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng* **1998**, 86 (11), 2278-2324.

130. Yu, K.-H.; Beam, A. L.; Kohane, I. S., Artificial intelligence in healthcare. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, 2 (10), 719-731.

131. Nguyen, L. M.; Nguyen, N. H.; Phan, D. T.; Kalagnanam, J. R.; Scheinberg, K. When Does Stochastic Gradient Algorithm Work Well? *arXiv e-prints* [Online], 2018. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2018arXiv180106159N> (accessed January 01, 2018).

132. Li, H.; Xu, Z.; Taylor, G.; Studer, C.; Goldstein, T. Visualizing the Loss Landscape of Neural Nets *arXiv e-prints* [Online], 2017. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2017arXiv171209913L> (accessed December 01, 2017).

133. He, K.; Zhang, X.; Ren, S.; Sun, J. Deep Residual Learning for Image Recognition *arXiv e-prints* [Online], 2015. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2015arXiv151203385H> (accessed December 01, 2015).

134. Bottou, L.; Bousquet, O. In *The tradeoffs of large scale learning*, Advances in neural information processing systems, 2008; pp 161-168.

135. Cun, Y. L.; Boser, B.; Denker, J. S.; Howard, R. E.; Hubbard, W.; Jackel, L. D.; Henderson, D., Handwritten digit recognition with a back-propagation network. In *Advances in neural information processing systems 2*, David, S. T., Ed. Morgan Kaufmann Publishers Inc.: 1990; pp 396-404.

136. Pedamonti, D. Comparison of non-linear activation functions for deep neural networks on MNIST classification task *arXiv e-prints* [Online], 2018. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2018arXiv180402763P> (accessed April 01, 2018).

137. Alcantara, G. Empirical analysis of non-linear activation functions for Deep Neural Networks in classification tasks *arXiv e-prints* [Online], 2017. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2017arXiv171011272A> (accessed October 01, 2017).

138. Arora, R.; Basu, A.; Mianjy, P.; Mukherjee, A. Understanding Deep Neural Networks with Rectified Linear Units *arXiv e-prints* [Online], 2016. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2016arXiv161101491A> (accessed November 01, 2016).
139. Xu, B.; Wang, N.; Chen, T.; Li, M. Empirical Evaluation of Rectified Activations in Convolutional Network *arXiv e-prints* [Online], 2015. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2015arXiv150500853X> (accessed May 01, 2015).
140. Clevert, D.-A.; Unterthiner, T.; Hochreiter, S. Fast and Accurate Deep Network Learning by Exponential Linear Units (ELUs) *arXiv e-prints* [Online], 2015. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2015arXiv151107289C> (accessed November 01, 2015).
141. Glorot, X.; Bordes, A.; Bengio, Y., Deep Sparse Rectifier Neural Networks. In *Proceedings of the Fourteenth International Conference on Artificial Intelligence and Statistics*, Geoffrey, G.; David, D.; Miroslav, D., Eds. PMLR: Proceedings of Machine Learning Research, 2011; Vol. 15, pp 315-323.
142. Halvorson, R. A.; Vikesland, P. J., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Environmental Analyses. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (20), 7749-7755.
143. Smith, W. E., Practical understanding and use of surface enhanced Raman scattering/surface enhanced resonance Raman scattering in chemical and biological analysis. *Chem Soc Rev* **2008**, *37* (5), 955-964.
144. Srivastava, N.; Hinton, G.; Krizhevsky, A.; Sutskever, I.; Salakhutdinov, R., Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting. *J. Mach. Learn. Res.* **2014**, *15* (1), 1929-1958.
145. Manak, M. S.; Varsanik, J. S.; Hogan, B. J.; Whitfield, M. J.; Su, W. R.; Joshi, N.; Steinke, N.; Min, A.; Berger, D.; Saphirstein, R. J.; Dixit, G.; Meyyappan, T.; Chu, H.-M.; Knopf, K. B.; Albala, D. M.; Sant, G. R.; Chander, A. C., Live-cell phenotypic-biomarker microfluidic assay for the risk stratification of cancer patients via machine learning. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2* (10), 761-772.
146. Wang, P.; Xiao, X.; Glissen Brown, J. R.; Berzin, T. M.; Tu, M.; Xiong, F.; Hu, X.; Liu, P.; Song, Y.; Zhang, D.; Yang, X.; Li, L.; He, J.; Yi, X.; Liu, J.; Liu, X., Development and validation of a deep-learning algorithm for the detection of polyps during colonoscopy. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2* (10), 741-748.

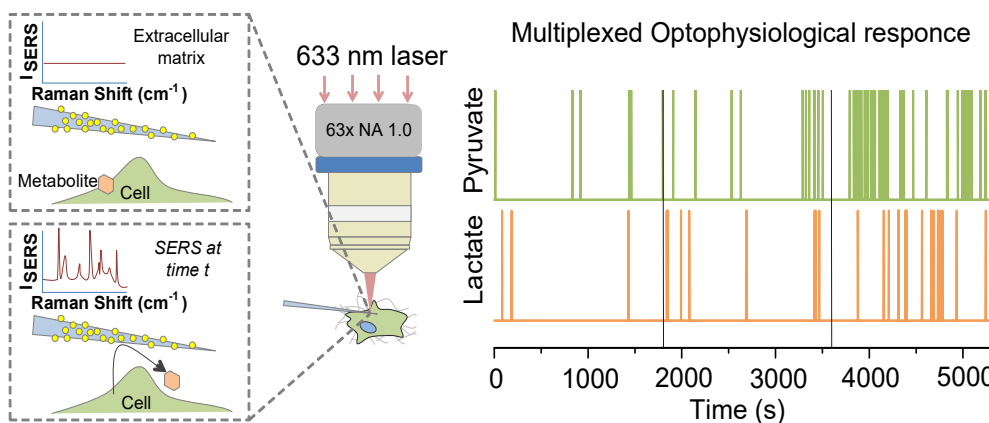
147. Lundberg, S. M.; Nair, B.; Vavilala, M. S.; Horibe, M.; Eisses, M. J.; Adams, T.; Liston, D. E.; Low, D. K.-W.; Newman, S.-F.; Kim, J.; Lee, S.-I., Explainable machine-learning predictions for the prevention of hypoxaemia during surgery. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, 2 (10), 749-760.
148. Im, H.; Pathania, D.; McFarland, P. J.; Sohani, A. R.; Degani, I.; Allen, M.; Coble, B.; Kilcoyne, A.; Hong, S.; Rohrer, L.; Abramson, J. S.; Dryden-Peterson, S.; Fexon, L.; Pivovarov, M.; Chabner, B.; Lee, H.; Castro, C. M.; Weissleder, R., Design and clinical validation of a point-of-care device for the diagnosis of lymphoma via contrast-enhanced microholography and machine learning. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, 2 (9), 666-674.
149. Lee, H.; Yune, S.; Mansouri, M.; Kim, M.; Tajmir, S. H.; Guerrier, C. E.; Ebert, S. A.; Pomerantz, S. R.; Romero, J. M.; Kamalian, S.; Gonzalez, R. G.; Lev, M. H.; Do, S., An explainable deep-learning algorithm for the detection of acute intracranial haemorrhage from small datasets. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, 3 (3), 173-182.
150. Krizhevsky, A.; Sutskever, I.; Hinton, G. E., ImageNet classification with deep convolutional neural networks. In *Proceedings of the 25th International Conference on Neural Information Processing Systems - Volume 1*, Curran Associates Inc.: Lake Tahoe, Nevada, 2012; pp 1097-1105.
151. Dunlop, J.; Bowlby, M.; Peri, R.; Vasilyev, D.; Arias, R., High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (4), 358-368.
152. Chen, Q.; Yim, P. D.; Yuan, N. N.; Johnson, J.; Cook, J. M.; Smith, S.; Ionescu-Zanetti, C.; Wang, Z. J.; Arnold, L. A.; Emala, C. W., Comparison of Cell Expression Formats for the Characterization of GABA(A) Channels Using a Microfluidic Patch Clamp System. *Assay Drug Dev. Technol.* **2012**, 10 (4), 325-335.
153. Bailey, M. R.; Martin, R. S.; Schultz, Z. D., Role of Surface Adsorption in the Surface-Enhanced Raman Scattering and Electrochemical Detection of Neurotransmitters. *J Phys Chem C* **2016**, 120 (37), 20624-20633.
154. McLellan, J. M.; Li, Z.-Y.; Siekkinen, A. R.; Xia, Y., The SERS Activity of a Supported Ag Nanocube Strongly Depends on Its Orientation Relative to Laser Polarization. *Nano Lett.* **2007**, 7 (4), 1013-1017.

155. Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Haran, G., Single Molecule SERS Spectral Blinking and Vibronic Coupling. *J Phys Chem C* **2011**, *115* (11), 4540-4545.
156. Gomez-Diaz, C.; Bargeton, B.; Abuin, L.; Bukar, N.; Reina, J. H.; Bartoi, T.; Graf, M.; Ong, H.; Ulbrich, M. H.; Masson, J.-F.; Benton, R., A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11866.
157. Zhu, H.; Lussier, F.; Ducrot, C.; Bourque, M. J.; Spatz, J. P.; Cui, W.; Yu, L.; Peng, W.; Trudeau, L. E.; Bazuin, C. G.; Masson, J. F., Block Copolymer Brush Layer-Templated Gold Nanoparticles on Nanofibers for Surface-Enhanced Raman Scattering Optophysiology. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11* (4), 4373-4384.

2. Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events*

2.1. Abstract

We monitored metabolite secretion near living cells using a plasmonic nanosensor.



The nanosensor created from borosilicate nanopipettes analogous to patch clamp was decorated with Au nanoparticles and served as a surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate with addressable location. With this nanosensor, we acquired SERS locally and temporally near Madin-Darby canine kidney (MDCKII) epithelial cells, and we detected multiple metabolites, such as pyruvate, lactate, ATP and urea simultaneously. These plasmonic nanosensors were capable of monitoring metabolites in the extracellular medium with enough sensitivity to detect an increase in metabolite concentration following the lyses of MDCKII cells with a non-ionic surfactant. The plasmonic nanosensors also allowed a relative quantification of chemical gradient for metabolites near cells, as demonstrated with a decrease in relative lactate to pyruvate concentration further away from the MDCKII cells. This SERS optophysiology technique for the sensitive and non-destructive monitoring of extracellular metabolites near

* Publié en tant que lettre dans *Nano Letters* : Lussier, F., Brulé, T., Vishwakarma, M., Das, T., Spatz, J., P., Masson, J.-F., *Nano Lett.*, **2016**, 16 (6), 3866–3871. T. B. a participé au développement des algorithmes de traitement de données, M. V. et T. D. ont effectué les différentes cultures cellulaires. J.P.S. a offert l'accès à ces laboratoires en Allemagne Ainsi que l'expertise de ses laboratoires pour la culture des cellules MDCKII.

living cells is broadly applicable to different cellular and tissue models and should therefore provide a powerful tool for cellular studies.

2.2. Introduction

Probing the cellular environment and the signalling mechanism of a group of living cells remains an important challenge in biology and medicine.¹⁻³ Studying cellular signalling pathways can, for example, allow the identification of biomarkers related to specific pathologies, identify up- or down-regulated pathways or monitor cellular response to changes in the environment. These types of studies contribute to the fundamental understanding of diseases for ultimately applying this knowledge for early medical diagnostic.⁴⁻⁷ However, chemical measurement at the length scale and in proximity of cells imposes stringent requirement on the measurement tools. Intercellular signalling pathways often result in the secretion of a small number of molecules, reaching zepto- to attomoles of chemical messengers, in a very short period of time.⁸⁻⁹ Despite tremendous development in nanotechnologies, modern analytical tools still experience difficulties to monitor the rapid and heterogeneous changes of the molecular content in the extracellular space with high temporal resolution and high selectivity during the cellular secretion events.¹⁰⁻¹²

For instance, electrochemistry using nano and micro-electrodes is one of the most employed modern analytical approach which provided a solution for monitoring electroactive molecules secreted by cells and has consequently spawned the field of amperometric electrophysiology. For example, this technique has been widely employed for monitoring neurotransmitters both *in vitro* and *in vivo* successfully for the study of neurological diseases.¹³⁻¹⁵ While it is extremely powerful for electroactive neurotransmitters, amperometric electrophysiology remains only applicable to a narrow range of molecules. Another commonly used approach to monitoring cellular secretion events is with fluorescence based biosensors which are, however, limited to molecules with intrinsic fluorescence and offer a poor capability for multiplex analysis. Alternatively, mass spectrometry (MS) is a relatively universal detector that is routinely applied to the characterization of the chemical components, but with great difficulty in real-time monitoring of cellular events with high spatial and temporal resolution. To address this challenge, highly sensitive, selective and minimally invasive sensors have been

developed for monitoring and characterizing specific cellular events while maintaining the integrity and viability of cells.¹⁶⁻¹⁷ However, modern analytical techniques still lack either the sensitivity or selectivity to investigate the heterogeneous composition of the cellular secretion during cellular communication events.

Optical nanosensors based on plasmonic nanomaterials hold promising capability to fulfill the current gaps in modern techniques and are now commonly applied in biosensing,¹⁸⁻²³ and surface-enhanced spectroscopies.^{1, 24-26} Among the suite of plasmonic techniques, surface-enhanced Raman scattering (SERS) benefits from the high electric field generated by the surface plasmon to reach high sensitivity for molecules adsorbed on the plasmonic material, and in the appropriate experimental conditions, the sensitivity of SERS can reach single-molecule (SM) detection.²⁷⁻²⁹ Furthermore, SERS provides an additional benefit from the unique vibrational fingerprint of molecules to identify analytes.³⁰ Using these advantages, imaging and probing of the intracellular matrix of cells were achieved with SERS.^{1, 30-33} SERS nanosensors consisting of adsorbed gold nanoparticles onto a patch-clamp nanopipette were reported to probe *in situ* the intracellular matrix content of cells.³⁴ Since this first report, several nanosensors including the SERS endoscope were developed to locally probe the intracellular matrix of cells with SERS.³⁵⁻³⁶ Despite the major advancement in *in situ* SERS sensing of cells, this field remains at the early stages of development for the identification and multiplexing capabilities of SERS to probe the intracellular matrix. Although its promising potential as a bioanalytical tool, SERS has not been reported to the best of our knowledge for neither sensing the extracellular medium nor characterizing and monitoring cellular secretion events, which are important challenges in biology and medicine.

To address current limitations of monitoring metabolites secretion in the extracellular environment, we presented here a nanosensor with sensitivity to the single molecule level. Specifically, we developed a plasmonic nanosensor decorated with gold nanoraspberries for SERS sensing (details in electronic supporting information - ESI), similarly to a previously reported sensor for protein detection.³⁷ Briefly, the optimal performance of the nanosensor was achieved for the reaction of a pulled glass capillary with 0.3% APTES solution in anhydrous ethanol for 30 minutes and of a gold nanoraspberries suspension for 90 minutes. Further details

about the optimization, characterization and evaluation of the single molecule sensitivity of the plasmonic nanosensor (Fig. S2.1- 4 and S2.7) are provided as electronic supporting information.

Following the optimization, the nanosensor was applied to detect molecules by dynamic SERS (D-SERS), an acquisition method consisting to the rapid acquisition of a series of SERS spectra. Raman spectroscopy is a well-established spectroscopy tool for the identification of molecule.³⁸ D-SERS can thus be applied for the identification of molecules secreted by cells to investigate the cells' secretome. We positioned the nanosensor in the vicinity of the living cells and D-SERS was monitored continuously on a single region near the tip of the nanosensor (Fig. 2.1) using a 633 nm laser (power of 3.85 mW) with a water immersion objective (NA = 1.0, 63x magnification).

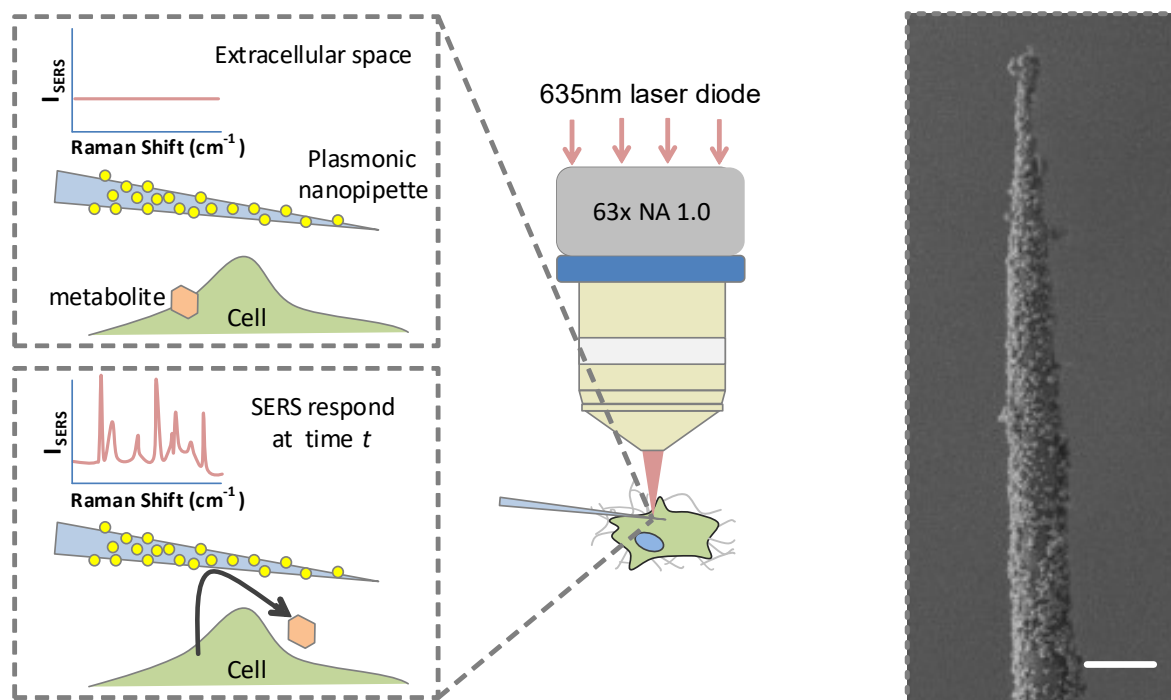


Figure 2.1 (Left) Representation of the concept of a SERS nanosensor to monitor cellular secretion. (Right) SEM image of a typical SERS nanosensor on a pulled glass capillary modified with gold nanoraspberries. The scale bar of the SEM image is 1 μm .

Similarly to previously reported D-SERS experiments, the diffusion of a metabolite in a hot-spot on the nanosensor led to an enhanced Raman spectrum specific to the molecule (Fig. 2.1). Based on this identification capability, an external SERS spectral database was thus

constructed with different standards to later identify unknown metabolites detected with the nanosensor located near living cells. Principal component analysis (PCA) was applied to extract a standard SERS spectrum of the respective pure solution of pyruvate, lactate, ATP, glucose and urea from multiple and separated D-SERS experiments (Fig. 2.2). Due to the high variability of the relative intensity in D-SERS experiments within the datasets for single metabolite, the spectra were barcoded with the 10 Raman bands of the highest intensity (Fig. S2.5). The barcodes were then compared to subsequent D-SERS experiments to identify detection events in monitoring cell secretion events. Also, due to the low number of events recorded in D-SERS experiments, the different molecules were quantified with the absolute number of positive identifications in a set period of time. Additional information on the generation of the SERS standard spectra and a discussion on the chemometric sorting algorithm is provided as ESI.

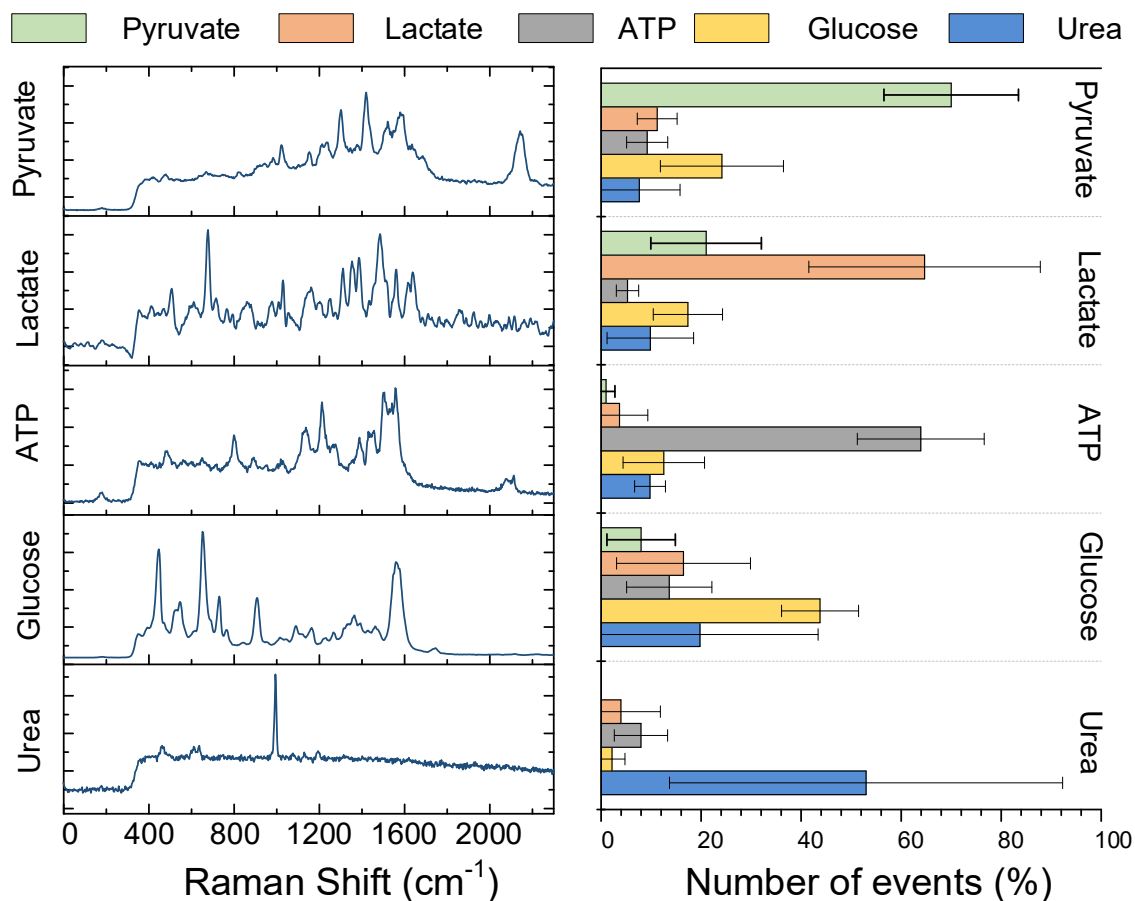


Figure 2.2 (Left) SERS spectra of pyruvate, L-lactate, ATP, D-glucose and urea generated by the first eigenvalue of principal component analysis (PCA). These experimental spectra were recorded for each molecule in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at a concentration of 1 μ M with the SERS nanosensor. These spectra were used as references to construct our SERS spectra database. From these standards, a barcode was generated from the 10 peaks with the highest intensity. (Right) Evaluation of the selectivity of the chemometric algorithm of the metabolites studied here. SERS measurements were performed on 5 different SERS nanosensors with a fresh standard solution of the corresponding molecule. The number of detection events per biomolecule was counted for the SERS spectra collected (500 spectra) using a 633 nm laser diode at 1 mW. The error bars represent the standard deviation (n = 5 experiments).

To ensure the selectivity of our sorting algorithm, we tested the algorithm for the detection of pure solutions of the different standards for evaluation of false positive identification (Fig. 2.2, n = 5 where n is the number of independent measurements). Results

showed that our chemometric approach exhibits high selectivity of 64-70% for pyruvate, lactate and ATP, with less than 20% false positive detection for other molecules. While the chemometric algorithm showed excellent selectivity for pyruvate, lactate and ATP, urea and glucose had selectivities on the order of 50%. The current limitation of the data analysis process was shown for molecules with large or small numbers of SERS bands. The SERS spectrum of glucose was relatively complex, while the one of urea had a single major band. This led to a higher probability of false identification of glucose with other molecules in the first case and an insufficient number of SERS bands in the latter case for urea led also to poorer selectivity. The relatively large error bars were associated with the random array of nanoparticles generated onto the surface of the pipette during the fabrication process. These different arrays led to an important variation of the plasmonic enhancement of the Raman signal and the number of hot-spots of individual nanosensors and thus the relatively large error bars. Different fabrication processes are currently under investigation to improve the reproducibility of the fabrication process.

To further evaluate the selectivity of the nanosensor, we generated different binary mixture constituted of equimolar mixtures of lactate and pyruvate and of lactate and ATP (Fig. S2.6). In both cases, the results clearly showed an equivalent number of events associated to the molecules of the mixture with less than 10% false identification of other molecules that were absent from the solution. These results also showed the capability of our chemometric algorithm to simultaneously identify and count the number of events associated to a sample containing multiple molecules. We used this capability to perform a bi-analyte experiment with an equimolar solution of pyruvate and lactate to further evaluate the single molecule sensitivity of the nanosensor. Bi-analyte experiment have been claimed as a solid proof of single molecule SERS sensitivity.³⁹⁻⁴⁰ Results (Fig. S2.7) clearly showed that more than 76% of the SERS spectra had a character of either pyruvate or lactate rather than a combination of both molecule indicating the single molecule sensitivity.⁴¹ Therefore, the plasmonic nanopipette and the chemometric algorithm allowed simultaneous detection and counting of multiple molecules and are capable of reaching the single molecule sensitivity regime.

After that evaluation of the multiplex capability and the selectivity of our chemometric algorithm, we used the nanosensors to locally probe cellular secretion events of living cells. The

nanosensor was located at 30 μm above Madin-Darby canine kidney (MDCKII) cells and the D-SERS response was recorded for periods of time up to hours. The D-SERS nanosensor was placed in close proximity to the cells to capture fluctuations in the chemical composition due to the molecules secreted by MDCKII cells. In a first step, the baseline response of the Opti-MEM medium was recorded with and without the presence of saponin in absence of cells (Fig. S2.8). The statistically equivalent response of the nanosensor in both experiment verified the absence of response from saponin. Saponin is a non ionic surfactant causing membrane perforation and lysis of the cells.⁴² It was used in the following experiments to generate multiple and long lasting pores in the cell membrane that were permeable to larger molecules and thus causing the trigger of cell secretion events.⁴³

MDCKII cells are commonly used as a model for studying cell growth regulation, metabolism and transport mechanism.⁴⁴⁻⁴⁶ By positioning the nanosensor in the close vicinity of the MDCKII cellular membrane ($\sim 10\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$), the release of lactate and pyruvate was monitored, with a temporal resolution of 1 second, since the membrane transport mechanism from the cytoplasm to the extracellular medium were the most important flux among other cellular transport.⁴⁷ Our current focus was placed on a subset of metabolites including lactate and pyruvate due to their importance in cell biology. Lactate is mainly produced from the reduction of pyruvate by L-lactate dehydrogenase (LDH) through the glycolysis.⁴⁸ Pyruvate is an extremely important metabolite involved in the biosynthesis of amino acids and in the production of ATP through the tricarboxylic acid cycle (TCA) and the mitochondrial respiratory chain.⁴⁸ In contrary to lactate, pyruvate is mainly accumulated in cells due to its use for multiple metabolic reactions.⁴⁷ Therefore, monitoring the level of lactate and pyruvate in the extracellular medium provides a strong model for the study of cellular metabolic pathways.

The relative concentration of extracellular metabolites was measured as the number of events detected in experiments of constant duration. The cells were first incubated in Opti-MEM for 30 minutes to acquire a baseline value of the D-SERS detection of the metabolites. In comparison to the experiments in absence of cells, a significant increase in pyruvate and lactate counts were observed associated to the presence of the MDCKII cells near the nanosensor (Fig. 2.3). This indicated that the nanosensor was sensitive to the presence of the cells and that it was able to capture the increased level of the metabolites in the extracellular medium. A comparison

between the numbers of events detected was performed in presence and in absence of the living cells to insure the validity of the response. Based on a Student t mean comparison test, a statistically different response with a 95% confidence interval was obtained for the number of lactate and pyruvate events due to the introduction of the living cells compared to the baseline signal in Opti-MEM in absence of cells.

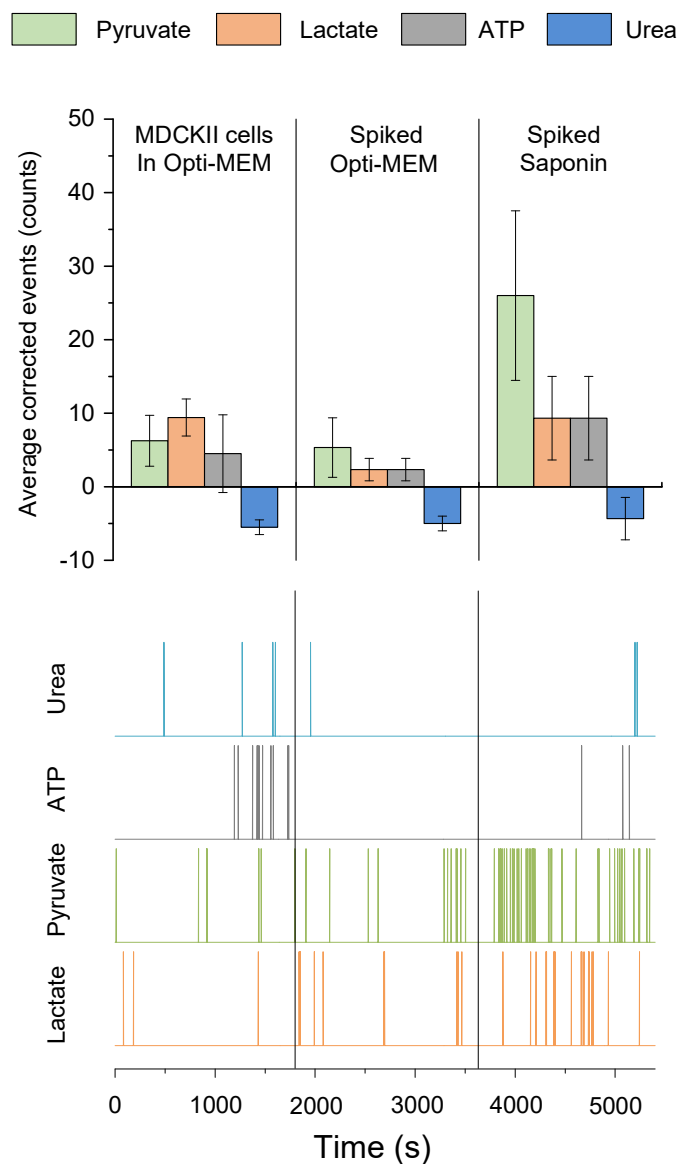


Figure 2.3 (Top) Average corrected number of event counted for different biomolecules: Pyruvate, lactate, ATP and urea in five different and independent cells samples – nanosensor couple. The SERS nanosensors were located 30 μm above the cells surface and kept at a constant height during the duration of the experiment. Measurements were carried in sterile Opti-MEM buffer. The number of events for the different section of the assay were all baseline corrected with the response of the nanosensor in steril Opti-MEM buffer in absence of cells. Spiked Opti-MEM and spiked saponin correspond respectively to the section when Opti-MEM and saponin were injected into the medium. (Bottom) A single temporal detection of urea, ATP, pyruvate

and lactate with dynamic SERS on the nanosensor. The kinetic measurements consisted of three distinct steps: (left) corresponding to the living cell in the Opti-MEM buffer, (center) corresponding to the addition of Opti-MEM and finally, (right) corresponding to the addition of 750 μ L of a saponin solution of 10 mg/mL in Opti-MEM. Positive identifications of the different metabolites are assigned the value of 1, noted by the spikes in the trace.

It is important to emphasize the potential for continuous monitoring of this D-SERS nanosensor. Figure 2.3 shows the detection of pyruvate, lactate, ATP and urea in real-time for a nanosensor located at 30 μ m above a MDCKII cells sample and a movie of this process is also available in the ESI. The real-time measurements (Fig. 2.3, lower panel, a movie is also provided on the internet) represents positive assignation to the D-SERS spectra at different time points for the corresponding metabolite detected in the extracellular medium above cells. The average number of events reported here was calculated from multiple independent experiments on different cellular samples ($n = 5$). The kinetic experiments were carried in three distinct sections of monitoring cells in Opti-MEM, injection of Opti-MEM (denoted as spiked Opti-MEM, Fig.2.3) and injection of saponin (denoted as spiked saponin, Fig. 2.3). The Opti-MEM step measured the background response, which was subtracted to all subsequent experiments. Also, since the nanosensor showed a statistically equivalent response in presence and in absence of saponin, no additional correction was subtracted. As a control, additional Opti-MEM was injected into the medium to ensure no perturbation of the cells from the manipulation of adding solution. Result showed no significant changes after the injection of Opti-MEM into the medium corresponding to the time trace from 1800 to 3600 s (Fig. 2.3). Finally, a significant increase in detection events was observed for pyruvate and lactate after the injection of saponin in the medium corresponding to time trace from 3600 to 5400 s. This rise in detection events is due to the generation of pores in the cellular membrane, which allowed metabolites contained in the intracellular matrix to diffuse in the extracellular space. By diffusion, the metabolites reached the surface of the nanosensor and thus, generated a characteristic SERS signal. A negative control was performed to rule out any effect of saponin available in the ESI (Fig. S2.8). We did not observe significant changes for ATP and urea in the current experiments. Running the experiment in absence of cells showed no difference in the detection level of metabolites before and after the injection of saponin (Fig. S2.8). Therefore, the elevated levels of pyruvate and

lactate were due to the perforation of cells with saponin. The important increase of pyruvate events showed is related to the intracellular concentration of pyruvate. As an essential nutriment, pyruvate is mainly accumulated into the cytosol of the cells prior to its conversion to acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) with pyruvate dehydrogenase (PDH) or in other metabolic reactions which was confirmed by our results.⁴⁷⁻⁴⁸ Therefore, multiplex monitoring of lactate and pyruvate in real-time into the extracellular medium showed good concordance with biological results which highlight the potential of the plasmonic nanopipette to characterize cellular secretions.

To further evaluate the local sensing capability of the nanosensor and to further demonstrate that the presence of the cells induced an increase in detection events, D-SERS measurements were performed at various cell – plasmonic nanopipette distances in Opti-MEM medium in absence of saponin. We recorded SERS spectra at 4 different distances corresponding to 20, 250, 500 and 1000 μm (Fig. 2.4). The relative number of events detected for pyruvate remained relatively constant at different distances showing no dependence on the distance of the nanosensor to the cells. However, an important tendency of decrease, but not statistically significant, ($p = 0.0869$, Unpaired t test) in the relative number of events associated to lactate was observed as the distance between the nanosensor and the cells increased. Lactate is a major by-product produced by glucose metabolism.⁴⁹ It is mainly secreted into the extracellular space through diffusion or carrier-mediated process at an important flux.⁵⁰ This important release explained the increase of counts for lactate as the probe – cell distance decrease. However, the release lactate is an order of magnitude higher than for pyruvate, while pyruvate is mainly up-taken in cells,⁴⁷ explaining the distance dependence of lactate and the independence for pyruvate. Thus, the nanosensor is a suited for local monitoring of cellular metabolism. These results highlight the promising potential of the nanosensor for monitoring fast heterogeneous changes into the extracellular space.

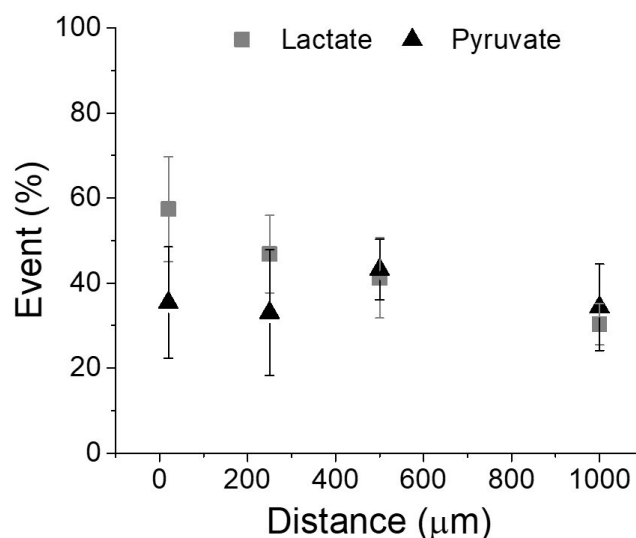


Figure 2.4 Relative number of events (%) for lactate (grey squares) and pyruvate (black triangles) near MDCKII cells measured at different nanosensor-cell distances in Opti-MEM in absence of saponin. The D-SERS measurements consisted of five identically prepared SERS nanosensors measured with four individual MDCKII cells samples using a 633 nm excitation wavelength at 3.85 mW. The error bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).

In conclusion, we developed a novel SERS nanosensor exhibiting high sensitivity apparent to the single molecule regime to locally probe cellular secretion events. The detection was based on a data processing method capable of sorting and counting metabolites in reference to a SERS spectra database. Hence, the selective detection of pyruvate, lactate, ATP and urea was demonstrated with low interference in a complex and biologically relevant matrix. The measurements near MDCKII cells showed sensitivity to the presence of the living cells. After the injection of saponin in the medium, an important increase in detection events for pyruvate was observed showing that cells released an important concentration of pyruvate. Finally, the nanosensor allowed distance dependence sensing of the extracellular medium. The nanosensor is thus a promising sensing tool for monitoring cell secretion event with temporal and spatial resolution.

2.3. Acknowledgements

The authors thank financial support from the Alexander von Humboldt Foundation (Research fellowship for experienced researchers – J.-F. Masson), the Fonds de Recherche Québécois – Nature et technologies (FRQ-NT) and the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. This work is also part of the excellence cluster CellNetwork at the University of Heidelberg. Support from the Max Planck Society is greatly acknowledged.

2.4. References

1. Kneipp, J.; Kneipp, H.; Wittig, B.; Kneipp, K., Novel Optical Nanosensors for Probing and Imaging Live Cells. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 214.
2. Gerald, A. U., Micro- and nanobiosensors—state of the art and trends. *Measurement Science and Technology* **2009**, *20* (1), 012001.
3. Walling, M. A.; Shepard, J. R. E., Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (7), 4049-4076.
4. Tu, Q.; Chang, C., Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2012**, *8* (5), 545-558.
5. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in Biodiagnostics. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1547-1562.
6. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with Plasmonic Nanosensors. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 442.
7. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A., The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740.
8. Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaître, F., Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion: Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2585.
9. Vo-Dinh, T., Nanosensing at the single cell level(). *Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy* **2008**, *63* (2), 95-103.
10. Huang, Y.; Cai, D.; Chen, P., Micro- and Nanotechnologies for Study of Cell Secretion. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (12), 4393-4406.

11. Muller, D. J.; Dufrene, Y. F., Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat Nano* **2008**, *3* (5), 261-269.
12. Zheng, X. T.; Li, C. M., Single cell analysis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (6), 2061-2071.
13. Santos, R. M.; Laranjinha, J.; Barbosa, R. M.; Sirota, A., Simultaneous Measurement of Cholinergic Tone and Neuronal Network Dynamics In Vivo in the Rat Brain Using a Novel Choline Oxidase Based Electrochemical Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *69*, 83.
14. Makos, M. A.; Han, K. A.; Heien, M. L.; Ewing, A. G., Using in Vivo Electrochemistry To Study the Physiological Effects of Cocaine and Other Stimulants on the *Drosophila melanogaster* Dopamine Transporter. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 74.
15. Suaud-Chagny, M. F., In Vivo Monitoring of Dopamine Overflow in the Central Nervous System by Amperometric Techniques Combined with Carbon Fibre Electrodes. *Methods* **2004**, *33*, 322.
16. Zheng, X. T.; Li, C. M., Single Cell Analysis at the Nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2061.
17. Vo-Dinh, T.; Alarie, J.-P.; Cullum, B. M.; Griffin, G. D., Antibody-Based Nanoprobe for Measurement of a Fluorescent Analyte in a Single Cell. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (7), 764-767.
18. Yonzon, C. R.; Stuart, D. A.; Zhang, X.; McFarland, A. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Towards Advanced Chemical and Biological Nanosensors—An Overview. *Talanta* **2005**, *67*, 438.
19. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P., Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2264-2271.
20. McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P., Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1057.
21. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547.
22. Cao, Y. W. C.; Jin, R. C.; Mirkin, C. A., Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection. *Science* **2002**, *297*, 1536.

23. Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A., Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science* **1997**, *277*, 1078.
24. Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S., Dependence of Fluorescence Intensity on the Spectral Overlap between Fluorophores and Plasmon Resonant Single Silver Nanoparticles. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 690.
25. Moskovits, M., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Brief Retrospective. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 485.
26. Yonzon, C. R.; Haynes, C. L.; Zhang, X. Y.; Walsh, J. T.; Van Duyne, R. P., A Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering: Improved Partition Layer, Temporal Stability, Reversibility, and Resistance to Serum Protein Interference. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 78.
27. Doering, W. E.; Nie, S. M., Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 311.
28. Chourpa, I.; Lei, F. H.; Dubois, P.; Manfait, M.; Sockalingum, G. D., Intracellular Applications of Analytical SERS Spectroscopy and Multispectral Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 993.
29. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Manoharan, R.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)—A New Tool for Single Molecule Detection and Identification. *Bioimaging* **1998**, *6*, 104.
30. Jun, B. H.; Noh, M. S.; Kim, J.; Kim, G.; Kang, H.; Kim, M. S.; Seo, Y. T.; Baek, J.; Kim, J. H.; Park, J.; Kim, S.; Kim, Y. K.; Hyeon, T.; Cho, M. H.; Jeong, D. H.; Lee, Y. S., Multifunctional Silver-Embedded Magnetic Nanoparticles as SERS Nanoprobes and Their Applications. *Small* **2010**, *6*, 119.
31. Wachsmann-Hogiu, S.; Weeks, T.; Huser, T., Chemical Analysis In Vivo and In Vitro by Raman Spectroscopy – From Single Cells to Humans. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 63.
32. Jaworska, A.; Jamieson, L. E.; Malek, K.; Campbell, C. J.; Choo, J.; Chlopicki, S.; Baranska, M., SERS-Based Monitoring of the Intracellular pH in Endothelial Cells: the Influence of the Extracellular Environment and Tumour Necrosis Factor- α . *Analyst* **2015**, *140*, 2321.

33. Vendrell, M.; Maiti, K. K.; Dhaliwal, K.; Chang, Y. T., Surface-Enhanced Raman Scattering in Cancer Detection and Imaging. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 249.
34. Vitol, E. A.; Orynbayeva, Z.; Bouchard, M. J.; Azizkhan-Clifford, J.; Friedman, G.; Gogotsi, Y., In Situ Intracellular Spectroscopy with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)-Enabled Nanopipettes. *ACS Nano* **2009**, *3* (11), 3529-3536.
35. Yan, R. X.; Park, J. H.; Choi, Y.; Heo, C. J.; Yang, S. M.; Lee, L. P.; Yang, P. D., Nanowire-Based Single-Cell Endoscopy. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 191.
36. Niu, J. J.; Schrlau, M. G.; Friedman, G.; Gogotsi, Y., Carbon Nanotube-Tipped Endoscope for In Situ Intracellular Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Small* **2011**, *7*, 540.
37. Masson, J. F.; Breault-Turcot, J.; Faid, R.; Poirier-Richard, H. P.; Yockell-Lelievre, H.; Lussier, F.; Spatz, J. P., Plasmonic Nanopipette Biosensor. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8998.
38. Schulz, H.; Baranska, M., Identification and Quantification of Valuable Plant Substances by IR and Raman Spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *43*, 13.
39. Blackie, E.; Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Timmer, M.; Burkett, B.; Northcote, P.; Etchegoin, P. G., Bi-analyte SERS with Isotopically Edited Dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 4147.
40. Blackie, E. J.; Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G., Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14466.
41. Zrimsek, A. B.; Wong, N. L.; Van Duyne, R. P., Single Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Critical Analysis of the Bisanalyte versus Isotopologue Proof. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 5133.
42. Podolak, I.; Galanty, A.; Sobolewska, D., Saponins as Cytotoxic Agents: A Review. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 425.
43. Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. S.; Becker, K., The Biological Action of Saponins in Animal Systems: A Review. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 587.
44. Cho, M. J.; Thompson, D. P.; Cramer, C. T.; Vidmar, T. J.; Scieszka, J. F., The Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 71.
45. Horio, M.; Chin, K. V.; Currier, S. J.; Goldenberg, S.; Williams, C.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Handler, J., Transepithelial Transport of Drugs by Cultured Madin-Darby Canine Kidney the Multidrug Transporter Cell Epithelia. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14880.

46. Irvine, J. D.; Takahashi, L.; Lockhart, K.; Cheong, J.; Tolan, J. W.; Selick, H. E.; Grove, J. R., MDCK (Madin–Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 28.
47. Sidorenko, Y.; Wahl, A.; Dauner, M.; Genzel, Y.; Reichl, U., Comparison of Metabolic Flux Distributions for MDCK Cell Growth in Glutamine- and Pyruvate-Containing Media. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 311.
48. Adeva-Andany, M.; López-Ojén, M.; Funcasta-Calderón, R.; Ameneiros-Rodríguez, E.; Donapetry-García, C.; Vila-Altesor, M.; Rodríguez-Seijas, J., Comprehensive Review on Lactate Metabolism in Human Health. *Mitochondrion* **2014**, *17*, 76.
49. Janke, R.; Genzel, Y.; Handel, N.; Wahl, A.; Reichl, U., Metabolic Adaptation of MDCK Cells to Different Growth Conditions: Effects on Catalytic Activities of Central Metabolic Enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 2691.
50. Rosenberg, S. O.; Fadil, T.; Schuster, V. L., A Basolateral Lactate/H⁺ Co-transporter in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells. *Biochem. J.* **1993**, *289*, 263.

2.5. Supporting information

2.5.1. Experimental details

2.5.1.1. Materials:

Hydrochloric acid, nitric acid, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), gold(III) chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$), (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES), D-(+)-glucose, sodium L-lactate, sodium pyruvate, adenosine triphosphate disodium and urea were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Sulfuric acid, 30% hydrogen peroxide and Corning™ cellgro™ Cell culture phosphate buffered saline 1X (PBS) were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Ethanol was purchased from Commercial alcohols (Brampton, ON). Standard wall borosilicate glass capillaries (1 mm outer diameter, 0.5 mm inner diameter and 10 cm length) were purchased from Sutter Instrument (Novato, CA). Ultrapure water was used for all the synthesis.

2.5.1.2. Instrumentation

Raman measurements were carried on an Alpha300 optical microscope from Witec (Ulm, Germany) with a 633 nm laser diode source from OZ optics (Ottawa, ON). All the measurements were done in PBS using a 63X Plan-Apochromat immersion objective ($\text{NA} = 1.0$) from Carl-Zeiss (Oberkochen, Germany). TEM images were performed on a Philips Tecnai 12 transmission electron microscope at 80 kV (Hillsboro, OR). UV-Vis spectra were obtained with a Cary Bio 100 UV-Vis Spectrophotometer from Varian (Santa Clara, CA). Zeta-potential and dynamic light scattering measurements were done on a Malvern zetasizer (Malvern, UK). Pipettes were pulled with a P-2000 laser based micropipette puller from Sutter Instrument (Novato, CA). Images of the nanosensors were acquired on a JEOL JSM-7400F high-resolution field emission scanning electron microscope (Tokyo, Japan) using a potential of 1.5 kV. An oxygen plasma cleaner from Plasma Etch (Carson City, NV) served to clean the nanosensor.

2.5.1.3. Nanoparticles synthesis

Prior to the nanoparticles synthesis, all glassware was cleaned with *Aqua regia* (3:1 HCl:HNO₃). *Caution, Aqua regia is highly corrosive!* Nanoraspberries were synthesized by adding 100 μ L of a 250 mM HAuCl₄ · 3 H₂O to 100 mL of water and 6.25 mL of a freshly prepared 100 mM HEPES aqueous solution was added at room temperature and stirred overnight. The Au nanoparticle suspension was then centrifuged at 11,000 rpm for 2 minutes and washed twice with water. TEM images were obtained at 80 kV to determine the shape and size of the Au nanoparticles. Dynamic light scattering (DLS) and zeta-potential measurements were acquired to evaluate the stability and the polydispersity of the nanoraspberries. UV-Vis spectrum of the purified nanoraspberries was acquired from 400 to 900 nm.

2.5.1.4. Nanosensor fabrication and functionalization:

Borosilicate glass capillaries (1 mm outer diameter, 0.5 mm inner diameter, 10 cm length) were pulled with a P-2000 laser base micropipette puller with the following parameters: Stage 1) Heat: 280, Filament: 3, Velocity: 15, Delay: 145, Pull: 20; Stage 2) Heat: 425, Filament: 0, Velocity: 15, Delay: 128, Pull: 200. As previously reported, these parameters afforded nanopipettes of nearly 500 nm diameter and 13° cone angle.¹ *Note that different instruments may require slightly different value to these parameters to afford equivalent nanopipettes.* Using a custom-designed Teflon holder, the pulled capillaries were immersed upside down in a 3:1 H₂SO₄:H₂O₂ piranha solution (*Caution, piranha solution is extremely corrosive and react violently with organic compound!*) for 90 minutes and rinsed thoroughly with water and finally with anhydrous ethanol. The pulled capillaries were then immersed in a freshly prepared solution of 0.3% APTES in anhydrous ethanol for 30 minutes with constant stirring. Afterward, the pulled capillaries were rinsed with anhydrous ethanol and sonicated in ethanol for 1 minute. The pulled capillaries were heated at 120 °C for 30 minutes and cooled at room temperature before storage. The APTES-functionalized pulled capillaries can be stored for a long period of time in cool and dry place. The pulled capillaries were then functionalized in a solution of freshly prepared gold nanoraspberries ($A_{600\text{ nm}} = 0.35$ A.U.) for 90 minutes with stirring at 700 rpm. At this point, the pulled capillaries were referred to the SERS nanosensor. The SERS

nanosensors were rinsed with water and HEPES was removed with an O₂ plasma for 30 minutes at 200 W. Finally, the resulting nanosensor were stored in a dry place until use.

2.5.1.5. Cell growth procedure:

Madin-Darby canine kidney (MDCKII, Health Protection Agency, UK) epithelial cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in minimum essential medium eagle (MEM, Sigma) supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 10 U mL⁻¹ penicillin, and 10 µg mL⁻¹ streptomycin (PenStrep, Invitrogen). These cells were split at 1:10 ratio, grown to 90% confluency, and passaged twice a week.

2.5.1.6. Cell secretion monitoring by dynamic SERS nanosensing:

MDCKII cells were rapidly rinsed with Opti-MEM buffer and positioned under the Raman microscope. Then, 1000 µL of sterile Opti-MEM buffer was carefully added to maintain cells integrity and to generate a meniscus between the water immersion microscope objective and the cells. The nanosensor was then manually positioned 30 µm above the cells with a XY micromanipulator. After stabilisation, SERS spectra were collected for 30 min. Then, 500 µL of sterile Opti-MEM was carefully added as a negative control. The solution was then gently stirred by repetitive collection – addition cycle with a volumetric micropipette. SERS spectra were then collected for another period of 30 min. Finally, 750 µL of 10 mg/mL saponin solution in sterile Opti-MEM were added to the mixture and gently stirred as mentioned above resulting in a final concentration of 5 mg/mL saponin in the medium. Again, SERS spectra were collected for another 30 min. The integration time was 1 sec/spectrum with a 633 nm laser excitation wavelength at a power of 3.85 mW. Time series were collected on 5 different nanosensors over 5 independently prepared cell samples.

2.5.2. Supplemental information for Results and Discussion

2.5.2.1. General conception of the plasmonic nanopipette:

The nanosensors were generated through the electrostatically adsorption of gold nanoraspberries onto the surface of an APTES functionalized borosilicate glass nanopipette

(Fig. S2.1a). The size of the nanoraspberries was evaluated by TEM (Fig. S2.1b) at an average size of 70 nm. Nanoraspberries were advantageous for several reasons. Their irregular shape generated multiple small branches inducing a high electrical field localized at their apex referred as the lightning rod effect.²⁻³ Their LSPR band was located around 600 nm as represented in the UV-Vis spectrum of the colloid solution in water (Fig. S2.1c) matching well the Raman laser for SERS experiments for high enhancement factor, as previously reported elsewhere.⁴

To generate an optimal nanosensor, the density of nanoraspberries at the surface of the pulled capillary must be optimized.^{4,5,6,7} Consequently, the exposure time to the APTES and to the Au nanoparticle suspension were investigated to insure an optimal nanoparticles density and inter-particles distance thereby generating a sensitive nanosensor. Briefly, an optimal SERS signal was achieved with an exposition to 0.3% APTES solution in anhydrous ethanol for 30 minutes and to the Au nanoparticle suspension for 90 minutes (Fig. S2.2 and S2.3). These results showed the generation of random organization with average density coverage of nanoraspberries of 50 particles per μm^2 ($n = 4$).

The resulting SERS nanosensors were characterized by SEM (Fig. S2.1a). The images showed large nanoparticles onto the surface of the nanopipette. APTES is well known to induce the aggregation of the nanoparticles caused by the formation of multiple layers.⁸ To insure that the APTES functionalization of the nanopipette would induce minimal aggregation onto its surface, we evaluated the size distribution and stability of the colloidal suspension prior adsorption by dynamic light scattering (DLS) and ζ -potential measurements (Fig. S2.4). These results showed a relatively large size distribution associated to an important polydispersity of the nanoraspberries synthesis. Also, we recorded a ζ -potential of -43.4 ± 0.6 mV, which implied a stable colloidal suspension at the deposition pH of 7.4. Based on these results, the large nanoparticles observed by SEM onto the nanopipette were associated to the large polydispersity of the synthesis rather than aggregation arising from nanoparticle exposition to the APTES functionalized pulled capillaries.

2.5.2.2. Data processing

To analyze the cellular secretion events, our approach was based on the development of a SERS spectral database of biologically relevant molecules. Thus, to generate our spectral

database, dynamic SERS (D-SERS) measurements were acquired for a series of metabolites. A nanosensor was exposed to a 1 μ M solution of the desired metabolite and 500 spectra were recorded. The integration time was 0.5 second/spectrum ($P = 1$ mW, 63X Plan-Apochromat immersion objective $NA = 1.0$) using a 633 nm laser diode.

Principal Component Analysis (PCA) was applied to each spectral time series. This statistical technique enabled sorting and converting the set of spectra to linearly uncorrelated spectra called principal components⁹⁻¹¹. The first component was associated to the maximum variance. Thus, this component was used to generate a standard spectrum of metabolites. At least 8 series were recorded for each metabolite to build a reliable library of standard SERS spectra for lactate, pyruvate, adenosine triphosphate (ATP), urea and glucose.

Using the *findpeaks* function in MatLab, a data processing algorithm was developed to identify spectra compared with the spectral database, as inspired by Patel *et al.*¹² All spectra were normalized before processing. A smoothing step was then performed on normalized spectra, first-derivative spectra and second-derivative spectra in the 360-2400 cm^{-1} range. The fingerprint determination of each spectrum was based on peak identification on the absolute second-derivative spectra.

For the standard spectra in the database, the threshold was set at 5% of the maximum second-derivative value for attributing a peak to a standard metabolite for a maximum of 10 Raman bands. These bands were attributed a value of “1” while the remainder of the spectra was set at a value of “0”. This process allowed the generation of a specific and unique barcode for all the standards, which were further used in the data processing (Fig. S2.5).

The same approach was applied on each experimental spectrum acquired in the D-SERS experiments with cells to attribute the Raman bands of the secreted analytes to known metabolites in the database. In this case, a minimum value was set at 10% of the maximum second-derivative value as a threshold for the identification. Also, the 6 most intense bands of the second-derivative spectra were assigned as the experimental spectra barcode. Each experimental barcode sets in the time series experiments were then compared to the different database standards based on these Raman fingerprints and positive matches were assigned the value of “1” for the metabolite at that time point being processed.

In the D-SERS detection events, the spectra recorded were compared to the standard SERS spectra database. During this process, peaks were identified and the 6 peaks of highest intensity were selected on every experimental spectrum. These peaks were compared to the 10 peaks of every standard in the database. To be identified as a positive match, the peaks must have a maximum bandwidth value of 12 cm^{-1} and separated by at least 25 cm^{-1} . A range of $\pm 15\text{ cm}^{-1}$ was tolerated on the peak position to be considered a match. A score of 1 was attributed to spectra meeting a threshold value of four positively identified peaks among the 6 selected using our previously stated criteria. Inversely, if the threshold conditions were not satisfied, it was considered a negative match and a score of 0 was recorded. The number of event was obtained by summing all the scores in a time series for each metabolite. Finally, the data were then normalized according to the total number of event counted in the time series to account in fluctuations from nanosensor to nanosensor.

2.5.2.3. Limited selectivity for glucose and urea

A number of 10 bands were used to generate the barcodes to offer a selective and multiplex identification of metabolite. Consequently, by using 10 bands, the algorithm became more restrictive towards larges metabolites exhibiting a more complex SERS spectrum, which lead to an important decrease in selectivity. The SERS spectrum of the glucose (Fig. 2.3E) showed an important number of high intensity bands located at 447, 521, 543, 650, 730, 910, 1365 and 1560 cm^{-1} which were have been extensively used elsewhere for its identification.¹³⁻¹⁴ This complex SERS spectrum showed poor selectivity since the algorithm was too restrictive for glucose sensing. A higher number of bands would allow an higher selectivity towards larger molecules with more complex SERS spectrum. Inversely, if the number of bands used in the algorithm was superior to the actual number of significant SERS bands in the spectrum, a decrease of selectivity was also observed. Yet, urea has one dominant Raman band at 995 cm^{-1} associated to the symmetrical C-N stretch¹⁵ and a few minor bands. Consequently, a barcode composed of 1 band located at 995 cm^{-1} and 9 additional bands extracted from minor bands and the noise of the spectrum would be considered. In this scenario, the algorithm was not enough restrictive leading to a significant decrease in selectivity, which was observed for urea. A number of 10 bands was chosen to allow the multiplex identification of the most probable molecule at the same time without important discrimination towards larger and biologically

relevant molecule like ATP. Thus, even if the algorithm allowed a label-free and multiplex analysis of metabolites, the number of bands composing their SERS spectrum must be of the same order of magnitude. Overall, the selectivity of the method enabled a multiplex sorting of different molecules in a complex, and biologically relevant matrix based on their unique SERS signature.

2.5.3. References:

1. Masson, J. F.; Breault-Turcot, J.; Faid, R.; Poirier-Richard, H. P.; Yockell-Lelievre, H.; Lussier, F.; Spatz, J. P., Plasmonic Nanopipette Biosensor. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8998.
2. Le, F.; Brandl, D. W.; Urzhumov, Y. A.; Wang, H.; Kundu, J.; Halas, N. J.; Aizpurua, J.; Nordlander, P., Metallic Nanoparticle Arrays: A Common Substrate for Both Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Infrared Absorption. *ACS Nano* **2008**, *2* (4), 707-718.
3. Yockell-Lelièvre, H.; Lussier, F.; Masson, J. F., Influence of the Particle Shape and Density of Self-Assembled Gold Nanoparticle Sensors on LSPR and SERS. *J Phys Chem C* **2015**, *119* (51), 28577-28585.
4. McFarland, A. D.; Young, M. A.; Dieringer, J. A.; Van Duyne, R. P., Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy. *J Phys Chem B* **2005**, *109* (22), 11279-11285.
5. Xu, H.; Aizpurua, J.; Käll, M.; Apell, P., Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. E* **2000**, *62* (3), 4318-4324.
6. Jain, P. K.; El-Sayed, M. A., Plasmonic Coupling in Noble Metal Nanostructures. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *487* (4), 153-164.
7. Jenkins, J. A.; Zhou, Y.; Thota, S.; Tian, X.; Zhao, X.; Zou, S.; Zhao, J., Blue-Shifted Narrow Localized Surface Plasmon Resonance from Dipole Coupling in Gold Nanoparticle Random Arrays. *J Phys Chem C* **2014**, *118* (45), 26276-26283.
8. Nath, N.; Chilkoti, A., Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5370-5378.

9. Brulé, T.; Yockell-Lelièvre, H.; Bouhélier, A.; Margueritat, J.; Markey, L.; Leray, A.; Dereux, A.; Finot, E., Sorting of Enhanced Reference Raman Spectra of a Single Amino Acid Molecule. *J Phys Chem C* **2014**, *118* (31), 17975-17982.
10. Das, G.; Gentile, F.; Coluccio, M. L.; Perri, A. M.; Nicastri, A.; Mecarini, F.; Cojoc, G.; Candeloro, P.; Liberale, C.; De Angelis, F.; Di Fabrizio, E., Principal Component Analysis Based Methodology to Distinguish Protein SERS Spectra. *J Mol Struct* **2011**, *993* (1), 500-505.
11. Etchegoin, P. G.; Meyer, M.; Blackie, E.; Le Ru, E. C., Statistics of Single-Molecule Surface Enhanced Raman Scattering Signals: Fluctuation Analysis with Multiple Analyte Techniques. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (21), 8411-8415.
12. Patel, I. S.; Premasiri, W. R.; Moir, D. T.; Ziegler, L. D., Barcoding Bacterial Cells: a SERS-Based Methodology for Pathogen Identification. *J Raman Spectrosc* **2008**, *39* (11), 1660-1672.
13. Lyandres, O.; Shah, N. C.; Yonzon, C. R.; Walsh, J. T.; Glucksberg, M. R.; Van Duyne, R. P., Real-Time Glucose Sensing by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Bovine Plasma Facilitated by a Mixed Decanethiol/Mercaptohexanol Partition Layer. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (19), 6134-6139.
14. Söderholm, S.; Roos, Y. H.; Meinander, N.; Hotokka, M., Raman Spectra of Fructose and Glucose in the Amorphous and Crystalline States. *J Raman Spectrosc* **1999**, *30* (11), 1009-1018.
15. Choi, C. J.; Wu, H.-Y.; George, S.; Weyhenmeyer, J.; Cunningham, B. T., Biochemical Sensor Tubing for Point-of-Care Monitoring of Intravenous Drugs and Metabolites. *Lab Chip* **2012**, *12* (3), 574-581.

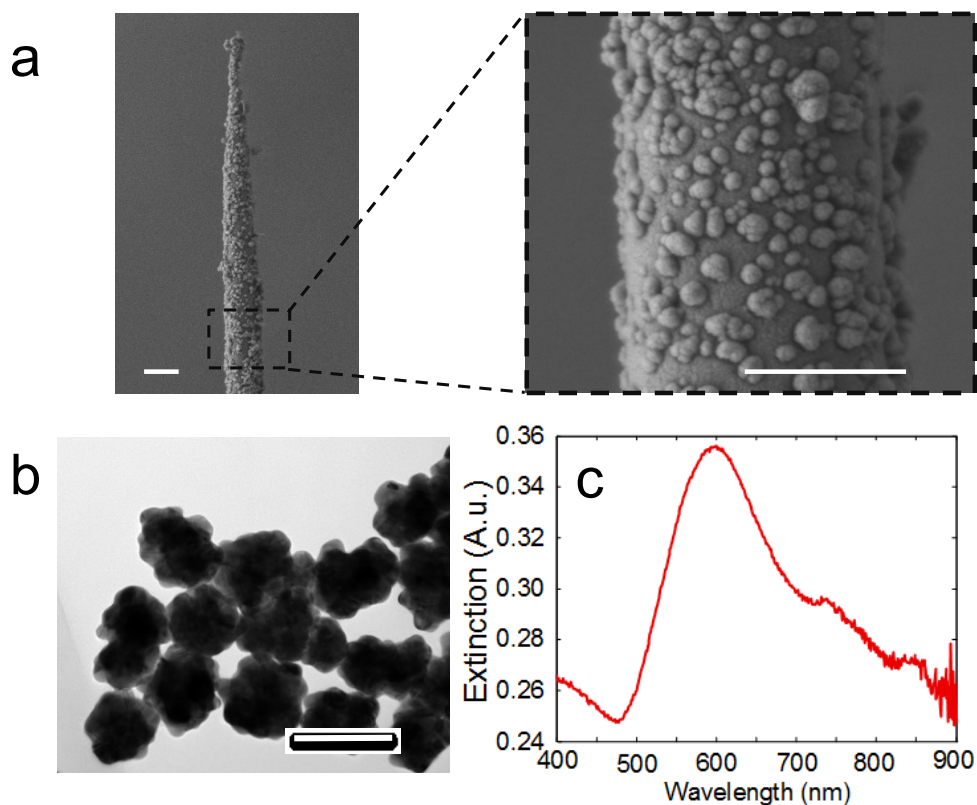


Figure S2.1 Characterisation of the SERS nanosensors functionalized with nanoraspberries. (a) SEM images of a typical pulled capillary covered with gold nanoraspberries (top left) and high magnification (top right). Scale bars of the SEM images are both 1 μm . (b) TEM image of the as-synthesized nanoraspberries. Scale bar of the TEM image is 100 nm. (c) UV-Vis spectrum of the colloid suspension in water.

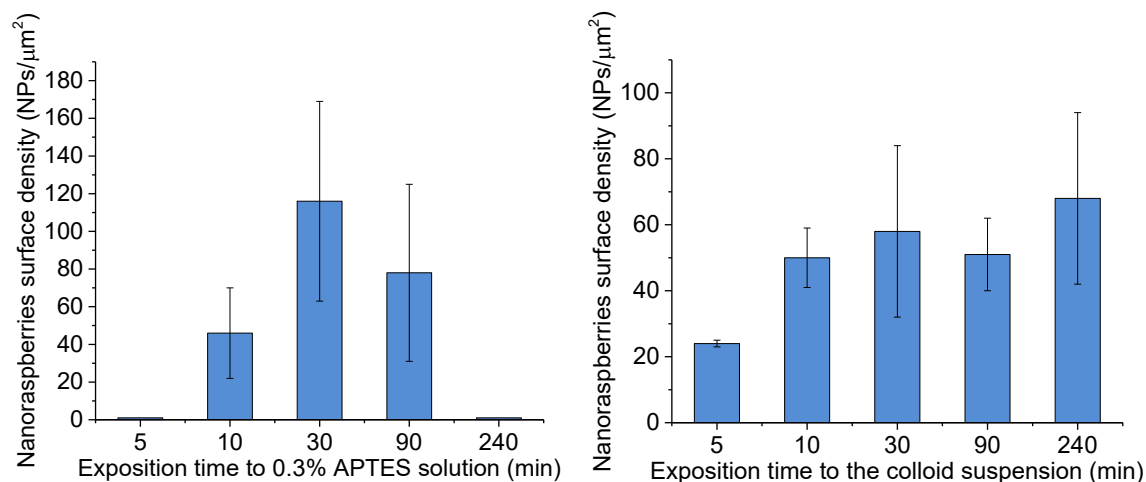


Figure S2.2 Surface density of gold nanoraspberries (in nanoparticles per μm^2) on an APTES functionalized pulled capillary for (left) different exposition time to a 0.3% APTES solution in anhydrous ethanol with a constant exposition time the colloidal suspension of 30 min and for (right) different exposition times to the colloidal suspension with an optimal APTES exposition time of 30 minutes. The nanoparticles surface density was evaluated by SEM ($n = 4$). The deposition pH of the colloidal suspension was 7.4 in all cases. The error bars represent the standard deviation ($n = 4$).

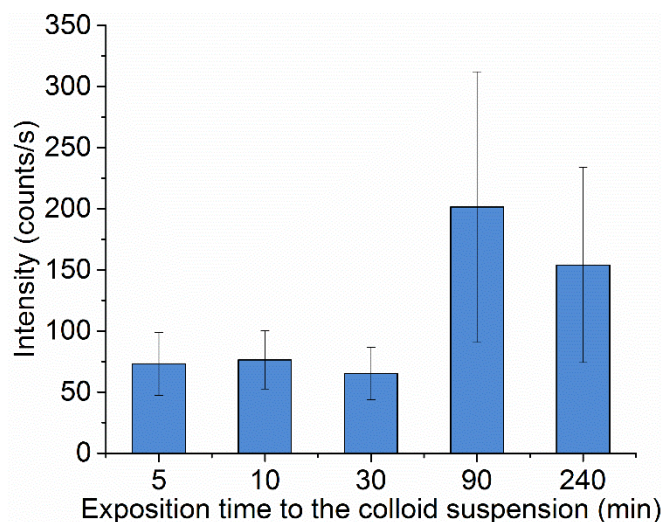


Figure S2.3 SERS intensity of the gold nanoraspberries for different exposition time to the colloidal suspension. SERS spectra were collected at the apex of 4 different plasmonic nanopipettes. Spectra were accumulated 10 times with an integration time of 10 seconds ($P =$

30 μ W, 63X Plan-Apochromat immersion objective NA = 1.0) using a 633 nm laser diode. The error bars represent the standard deviation.

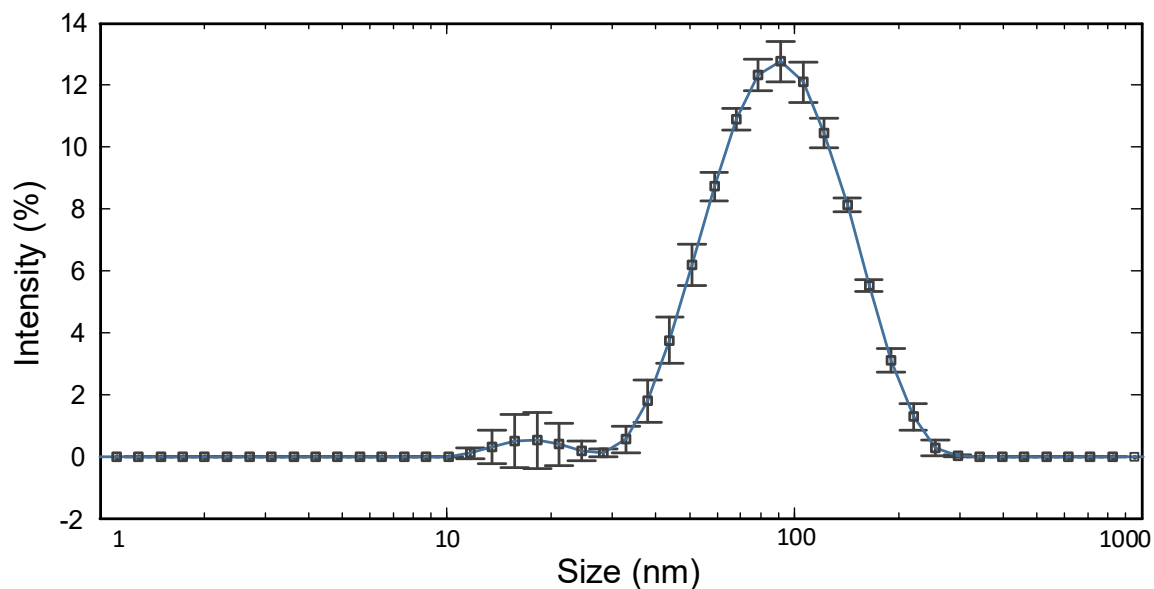


Figure S2.4 Semi log curve corresponding to dynamic light scattering (DLS) measurements of gold nanoraspberries in water at room temperature. Measurements were performed on 3 different samples at pH 7.4. The error bars represent the standard deviation.

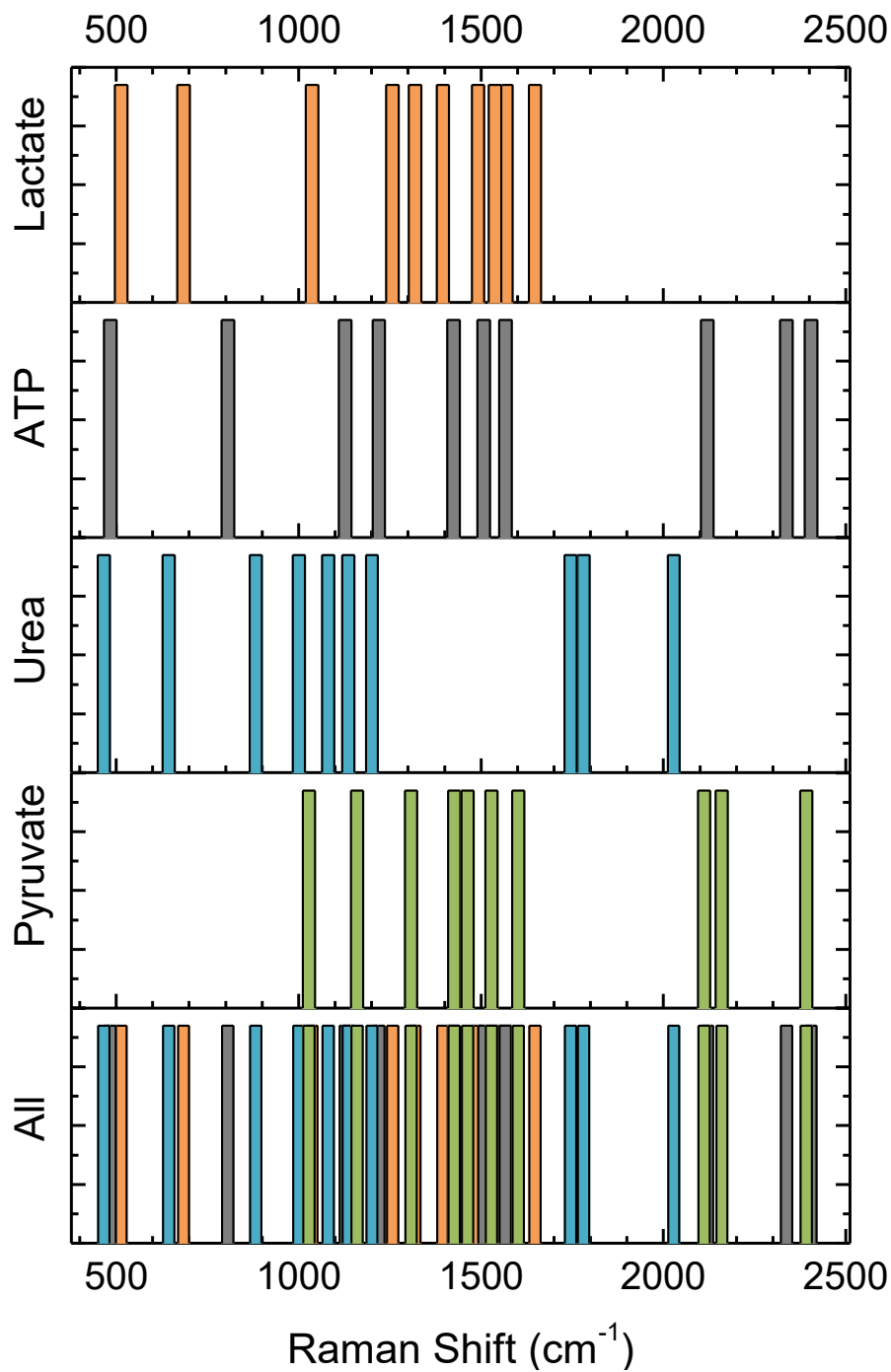


Figure S2.5 Representation of the barcodes generated by the chemometric algorithm for lactate, ATP, urea, and pyruvate. The bottom graph showed the overlaid representation of the barcodes for the four different molecules. The width, ω , of each bar is 30 cm^{-1} corresponding to a value $\omega/2$ of 15 cm^{-1} used in the chemometric algorithm.

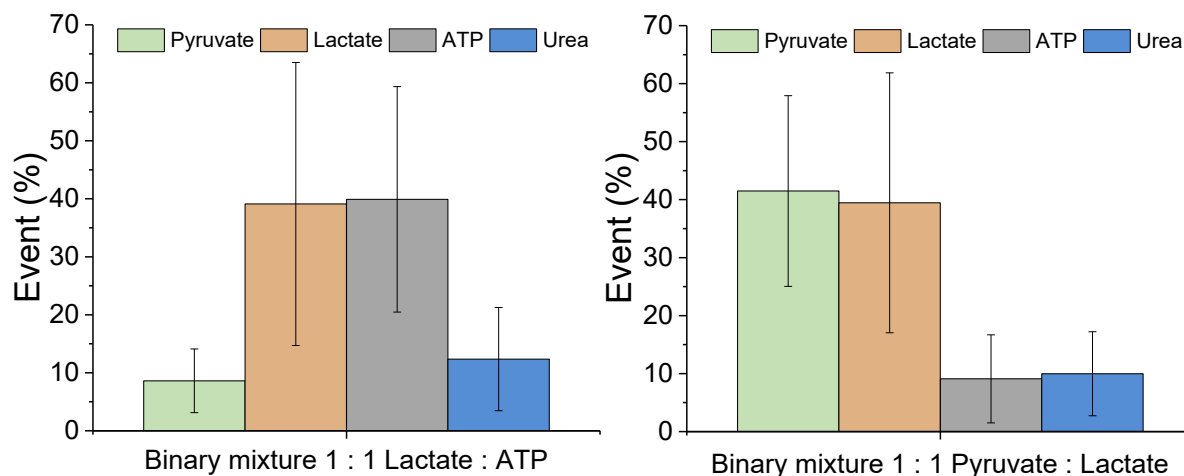


Figure S2.6 Number of events for binary mixtures according to the SERS identification and counting by the SERS nanosensor in a 10 μM solution of each of the corresponding biomolecules. Binary mixture lactate : ATP (left), and binary mixture pyruvate : lactate (right). The error bars represent the standard deviation ($n = 4$).

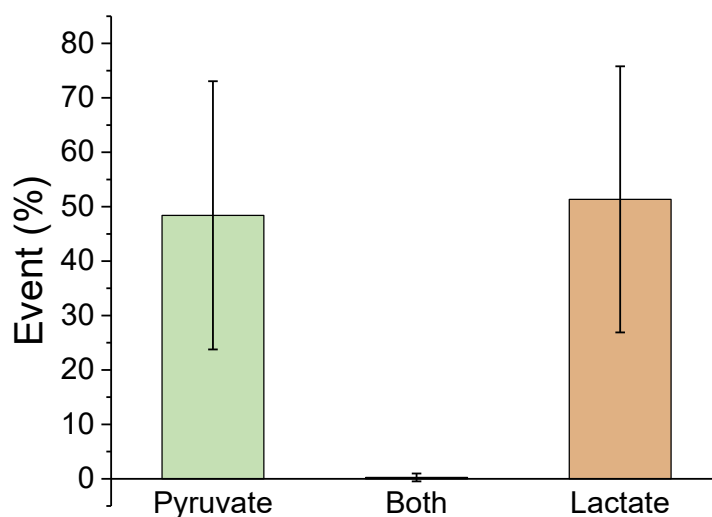


Figure S2.7 Bi-analyte SERS experiment containing 1 μM equimolar solution of pyruvate and lactate using a plasmonic nanopipette. 500 SERS spectrum were collected per series with an integration time of 500 milliseconds ($P = 1.0$ mW, 63X Plan-Apochromat immersion objective $\text{NA} = 1.0$) using a 633 nm laser. The error bars corresponded to the standard deviation ($n = 9$, where n represent the number of independent measurements).

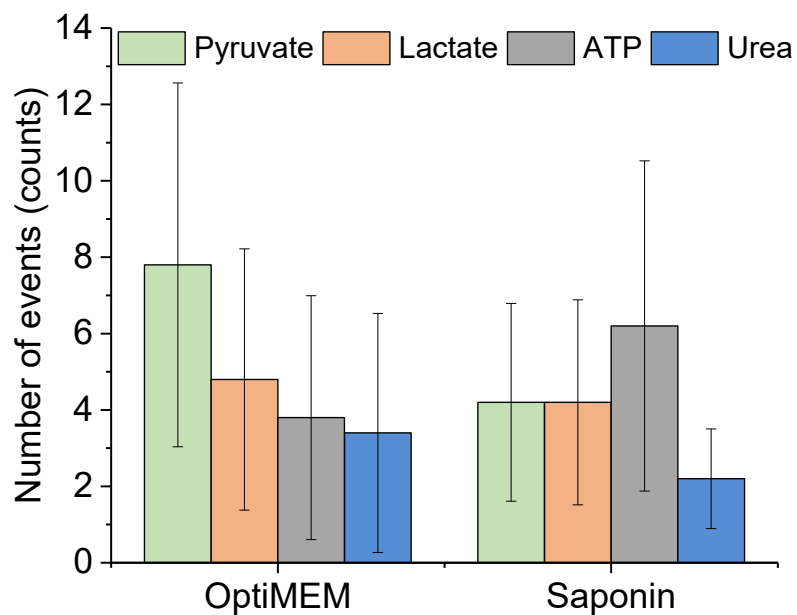


Figure S2.8 Evaluation of the Opti-MEM baseline and saponin by D-SERS. Measurements were performed on 4 different plasmonic nanopipettes. 1800 spectra were collected for Opti-MEM baseline and saponin injection with an integration time of 1 second ($P = 3.85$ mW, 63X Plan-Apochromat immersion objective $NA = 1.0$) using a 633 nm laser. The error bars represent the standard deviation

3. Dynamic SERS Nanosensor for Neurotransmitter Sensing Near Neurons^{*}

3.1. Abstract

Current electrophysiology and electrochemistry techniques have provided unprecedented understanding of neuronal activity. However, these techniques are suited for a small, albeit important, panel of neurotransmitters such as glutamate, GABA and dopamine, but these constitute only a subset of the broader range of neurotransmitters involved in brain chemistry. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) provides a unique opportunity to detect a broader range of neurotransmitters in close proximity of neurons. Dynamic SERS (D-SERS) nanosensors based on a patch-clamp-like nanopipettes decorated with gold nanoraspberries can be located accurately under a microscope using techniques analogous to those used in current electrophysiology or electrochemistry experiments. In this manuscript, we demonstrate that D-SERS can measure in a single experiment ATP, glutamate (glu), acetylcholine (ACh), GABA and dopamine (DA), among other neurotransmitters, with the potential of detecting a greater number of neurotransmitters. The SERS spectra of these neurotransmitters were identified with a barcoding data processing method and time series of the neurotransmitter levels were constructed. The D-SERS nanosensor was then located near cultured mouse dopaminergic neurons. Detection of neurotransmitters was performed in response to a series of K⁺ depolarisations, and allowed the detection of elevated levels of both ATP and dopamine. Control experiments were also performed near glial cells, showing only very low basal detection neurotransmitters events. This paper demonstrates the potential of D-SERS to detect neurotransmitter secretion events near living neurons, but also constitutes a strong proof-of-

^{*} Publié en tant que qu'article dans *Faraday Discussion* : Lussier, F., Brulé, T., Bourque, M.-J., Ducrot, C., Trudeau, L.-E., Masson, J.-F., *Faraday Discuss.*, **2017**, 205, 387-407. M.-J. B. et C. D. ont effectué les différentes cultures cellulaires. C. D. a procédé à l'acquisition des images de fluorescence suite à l'immunocytochimie. L.-E. T. a commenté l'article et participé au développement des expériences.

concept for the broad application of SERS to the detection of secretion events by neurons or other cell types to study normal or pathological cell functions.

3.2. Introduction

Extracellular chemical signaling pathways are involved in a plethora of biological and physiological processes. The central nervous system (CNS) is a focal point of this research field due to the complexity of cell-to-cell communication in this organ combined with the broad range of physiopathological mechanisms affecting brain circuits in various diseases. Neurological and psychiatric diseases such as Alzheimer's, Parkinson's or schizophrenia are associated with changes in brain neurochemistry.¹⁻³ A more thorough understanding of the relative changes in the basal and stimulated levels of multiple neurotransmitters in different brain regions is necessary to further advance research on the causes of CNS diseases. This requirement challenges the field to design techniques allowing detection of nanomolar levels of multiple neurotransmitters with sufficient temporal resolution (milliseconds) and spatial resolution (micrometer) to capture the intricate complexity of brain neurochemistry.⁴

Classical neurochemistry techniques⁵ involve the use of electrochemistry and electrophysiology using miniature electrodes or sensors allowing the detection of membrane currents caused by activation of ionotropic membrane receptors or neurotransmitters themselves at the single neuron levels, in acute brain slices or in living brain tissue.⁶⁻⁷ Microsampling and chromatographic techniques can also be used to detect neurotransmitters, but generally suffer from lower temporal and spatial resolution.⁸ Electrode-based electrochemistry has provided an unprecedented level of understanding of CNS diseases by allowing the detection of neurotransmitters such as dopamine (DA) serotonin (5-HT) and glutamate (glu) in the brain.⁹⁻¹¹ It still constitutes a vibrant research field as measurements are now performed in living animals over extensive periods of time.¹²⁻¹⁴ However, electrochemistry has limited multiplexing capability and more readily detects electroactive neurotransmitters like DA and 5-HT.¹⁵⁻¹⁶

Electrophysiological techniques can provide synapse-specific readouts of neurotransmitter release at high temporal resolution. However, because they usually rely on changes in membrane current or potential caused by transmembrane ionotropic receptors, these approaches are limited to neurotransmitters activating such receptors, mainly γ -aminobutyric

acid (GABA) and glu. The lack of multiplexing capacity in electrochemical and electrophysiological experiments is a major limitation because there is growing evidence that neurons have the capacity to co-release multiple neurotransmitters. For example, in recent years, and especially since the discovery of the expression of vesicular glutamate transporters in neuronal populations not known to use glutamate as a neurotransmitter, much work has revealed that subpopulations of dopaminergic, serotonergic, cholinergic and GABAergic neurons also use glutamate as a cotransmitter.¹⁷ Therefore, the development of novel molecular sensing techniques capable of capturing the molecular complexity of neurochemistry is presently a major challenge in neuroscience.

Molecular spectroscopy constitutes a promising solution for monitoring neurotransmitters and the field of “optophysiology” should provide solutions for multiplexed measurements of neurotransmitters or other cellular metabolites. Neurotransmitters have sparked interest in the SERS community early on and SERS spectra of neurotransmitters including DA,^{18,19} 5-HT,²⁰ GABA,²¹ glu,^{22,23} and acetylcholine (ACh)²⁴ were reported soon after the discovery of SERS. However, most of these early studies reported the analysis of a single or two neurotransmitters^{25,26} and the multiplexing capability of SERS has not yet been fully exploited. Despite this early interest, few studies have been published in the field until recently. For example, Schultz and co-workers described the role of surface adsorption for the detection of five neurotransmitters using combined electrochemistry and SERS.²⁷ Cell-based neurotransmitter assays using SERS have been reported for norepinephrine.²⁸ Others have reported microfluidic platforms for analysis of single cells²⁹ and a plasmonic agarose gel was designed for potential in vivo approaches.³⁰ Monitoring of DA release from the PC12 cell line has been attempted with a colloidal suspension of Au NP, but the SERS intensity was very weak in physiological conditions.³¹ An array of 3D antenna was proposed to simultaneously monitor the electrochemical response and intracellular Raman of metabolites and biomolecules (adenine, tryptophan and phenylalanine among others) of living neurons in culture.³² Also, Cote and co-workers have reported the utilisation of SERS for diagnostic of brain trauma in rats³³, which showcases a promising application of SERS in neuroscience. While these results are encouraging, more research is needed to develop SERS specifically for the detection of neurotransmitter secretion.

A SERS technique is ideally adapted for neuroscience research labs should ideally make use of infrastructure and techniques similar to those already used for current electrochemical and electrophysiological recordings, thus facilitating adoption by the neuroscience community. We³⁴, and others³⁵⁻³⁷ have proposed the use of surface-enhanced Raman scattering (SERS) on pulled glass rods or capillaries, similar to the ones used for nanoelectrodes and patch clamp experiments, for monitoring molecular composition near or inside living cells and neurons. Pulled glass rods or capillaries hold the advantage of being similar to carbon fiber nanoelectrodes and to patch-clamp nanopipettes, techniques largely adopted by the neuroscience community. In addition, they can be easily mounted on the piezo stage of a scanning probe microscope (SPM), analogous to some tip-enhanced Raman scattering (TERS) probes.³⁸ Hence, we recently showed the measurement of several common cellular metabolites (ATP, glucose, urea, pyruvate and lactate) by using these types of SERS-active pulled nanopipettes. In a proof-of-concept experiment, we also showed that saponin-induced pore formation in MDCKII cells elevated extracellular pyruvate levels³⁹. The selective detection of these metabolites was possible using a data processing algorithm based on the adaptation of Ziegler's barcode process as detailed below.⁴⁰ The SERS spectra were acquired in a rapid dynamic process at 1 to 10 Hz frequency, similar to the acquisition speed of fast scan cyclic voltammetry (FSCV), commonly used in electrochemistry experiments in neuroscience. Optical measurements on pulled capillaries or optical fibers are also applicable to other spectroscopic techniques. For example, an interesting approach was reported recently for fluorescence sensing of DA with a pulled fiber optic with the tip modified with quantum dots, an approach with a strong potential for *in vivo* applications.⁴¹ This latter fluorescence approach bears conceptual similarities with the one presented here, suggesting that D-SERS optophysiology could also be considered for *in vivo* applications.

Based on these early successes with metabolite detection, we show here that D-SERS can be used to detect neurotransmitters near neurons in physiological conditions and discriminate the levels of neurotransmitters from background conditions. The D-SERS nanosensor was validated with a series of neurotransmitters and the barcode data processing algorithm was optimized to improve selectivity and sensitivity towards a selected panel of important neurotransmitters. We also implemented fluorescence imaging on an AFM-Raman

microscope to visualise the morphology of the cultured neurons and accurately position the D-SERS nanosensor near the expected sources of neurotransmitter secretion. Fluorescence imaging also served to control the viability of neurons during experiments. We finally demonstrate sensing of neurotransmitters released in response to K^+ depolarisation of neurons, an experimental condition frequently used in neuroscience to demonstrate activity-dependent release. This article constitutes the technological and scientific basis for D-SERS optophysiological experiments with neurons and reports the first multiplexed measurements of neurotransmitters released by living neurons.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Chemometric data processing

Inspired by Patel *et al.*,⁴⁰ we previously developed a novel chemometric approach based on barcoding in order to analyse complex and heterogeneous signals detected using D-SERS.³⁹ Briefly, data processing required three steps. We first generated training sets with Raman spectra of biologically relevant metabolites referred to as standards from here on. The standards were barcoded constantly using 10 Raman bands extracted from the second derivative spectra. We then extracted an experimental barcode for each Raman spectrum acquired in an experiment. Finally, we sequentially compared each experimental barcode to every standard barcode. Positive matches between an experimental spectrum and a reference spectrum of a metabolite was counted as “1”, the number of positive matches between the barcodes depending on a specified threshold. Time traces were then constructed with hits for a metabolite reported as “1” and “0” on cases of mismatches, leading to a trace analogous to that generated in electrophysiology or electrochemistry experiments. This chemometric approach allowed the selective sorting and counting of detection events of 4 metabolites in a single experiment.³⁹

While this approach worked well in our early experiments, we observed the loss of both selectivity and sensitivity if the Raman spectrum of a metabolite had significantly more or less than 10 Raman bands. In such cases, we were either: too restrictive if 10 Raman bands were insufficient to characterize the standard, or not restrictive enough if there were fewer than 10 Raman bands in the standard Raman spectrum. We imposed a threshold of 60 % for positive

assignment of an experimental spectrum to a metabolite, corresponding to the percentage of bands (*e.g.* 6 bands out of 10) from a standard spectrum identified in an experimental spectrum. Experimental spectra with more than 6 bands corresponding to a standard spectrum were thus identified as this metabolite, which ensured a high selectivity toward the metabolites and minimising false positives. However, the threshold was relatively restrictive and consequently, reducing the sensitivity of the process.

To solve this data processing challenge, we implemented here a procedure to allow a variable number of Raman bands to constitute the standard and experimental Raman barcodes of different neurotransmitters. This procedure allowed to have the appropriate number of bands in the standard Raman spectrum to maximise selectivity and sensitivity and to select the appropriate threshold for positive assignment of an experimental spectrum to a neurotransmitter. A combinatorial computational approach was implemented to identify a series of optimal parameters in the barcoding algorithm for maximising selectivity and sensitivity. The number of Raman bands composing the standard's barcode and the experimental barcode, the threshold for positive assignment of an experimental spectra to a metabolite, the bandwidth of the Raman bands, the maximal spectral wandering allowed, and the minimal resolution (distance in cm^{-1} between Raman bands) were systematically varied to maximise the number of positive events and minimise the false positive assignment of experimental spectra to other neurotransmitters of a pure standard for the neurotransmitter for which the data processing algorithm was optimised. This ensured the highest sensitivity and selectivity for every neurotransmitter.

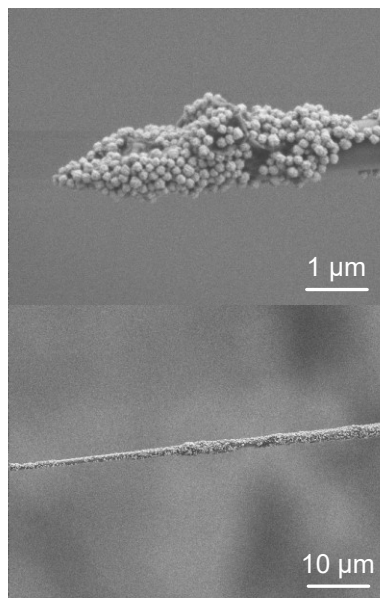


Figure 3.1 Scanning electron microscopy (SEM) images of a typical D-SERS nanosensor coated with 70 nm gold nanoraspberries. (Top) SEM image at a magnification of $\times 10\,000$ of the tip of the nanosensor and (Bottom) body of the nanosensor at a magnification of $\times 1000$.

We then trained the data processing algorithm using the D-SERS nanosensor (Fig. 3.1) in conditions similar to experiments for monitoring neurotransmitter secretion from neurons. In a first step, a standard Raman library was acquired for relevant neurotransmitters, DA, glu, adenosine triphosphate (ATP), ACh and GABA (Fig. 3.2). Barcodes were composed of 6, 14, 11, 10 and 11 bars for DA, glu, ATP, ACh and GABA respectively. The bandwidth was 16 cm^{-1} and the minimal resolution was 20 cm^{-1} for every neurotransmitter. The number of bands in the barcodes and the thresholds for positive assignments for the standards were determined from eight series of 1000 SERS spectra collected on different, but identically prepared nanosensors. Optimal number of bands for every standard is shown in Figure 3.2 and summarized in Table 1, while the Raman shift associated to the barcodes corresponded to Raman shifts previously reported for these molecules.

Table I. Optimized chemometric parameters for sensitive and selective sorting of different neurotransmitters. The threshold value corresponded to the closest integer value to 70 % of the number of experimental bands.

Neurotransmitter	# bands / experimental spectra	# bands / reference spectra	Threshold
Dopamine (DA)	5	6	4
Glutamate (glu)	13	14	9
Adenosine triphosphate (ATP)	6	11	4
Acetylcholine (ACh)	10	10	7
γ -aminobutyric acid (GABA)	10	11	7

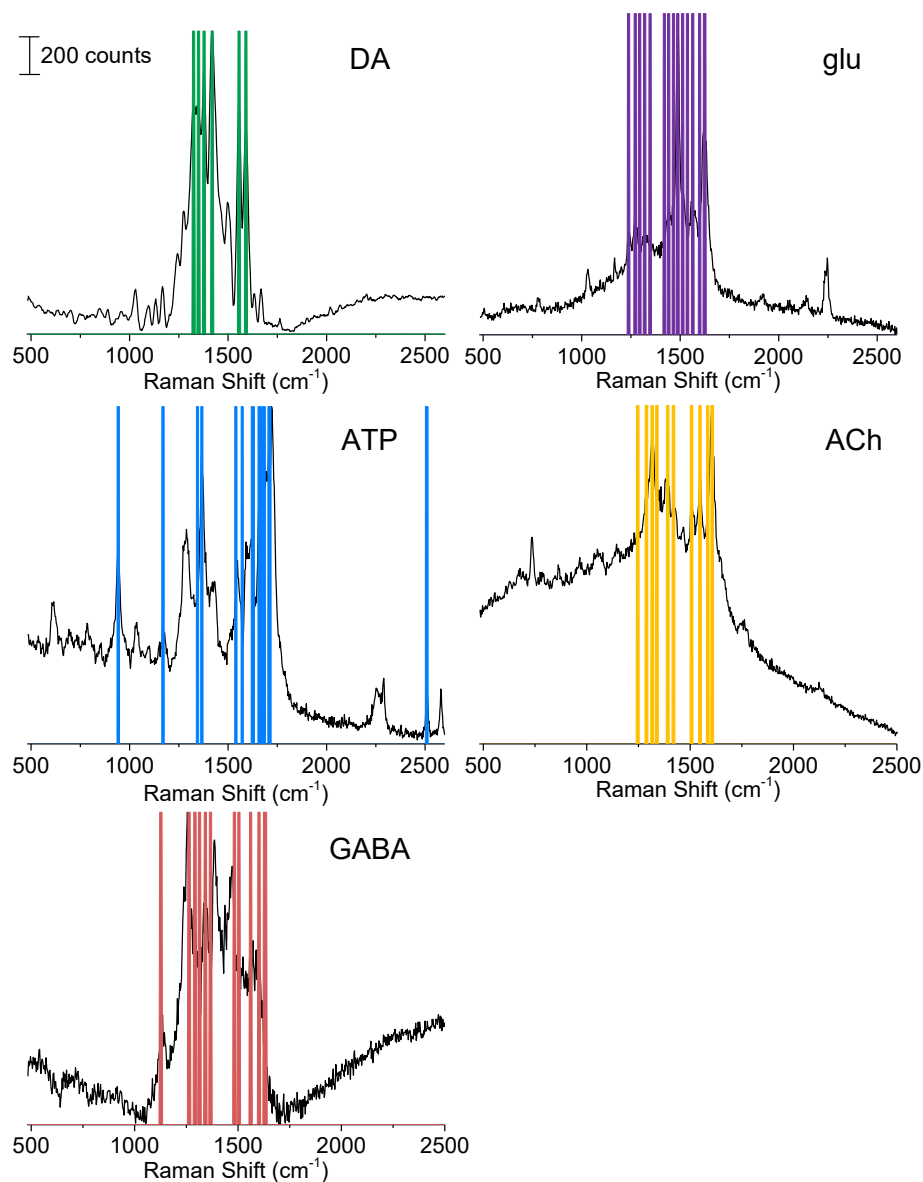


Figure 3.2 SERS spectra of dopamine (DA), glutamate (glu), adenosine triphosphate (ATP), acetylcholine (ACh) and γ -aminobutyric acid (GABA) and their corresponding barcode. The barcodes were extracted according to the optimal number of bands determined by the optimisation of the data processing algorithm. Barcodes were composed of 6, 14, 11, 10 and 11 bands for DA, glu, ATP, ACh and GABA respectively. The bandwidth, corresponding to the acceptability tolerance for a positive assignment was 16 cm^{-1} and corresponded to the width of the bars in the figures. The standard spectra corresponded to the sum of the first three principal

components (PCs). SERS measurements were performed on different nanosensors in a freshly prepared solution in phosphate saline buffer (PBS) pH 7.4 of the corresponding standards at a concentration of 1 mg/mL in every case. We used a 633 nm laser diode at 1 mW with an integration time of 500 ms per spectrum.

We then assessed the selectivity of the chemometric data processing algorithm in pure solutions of a single neurotransmitter. In these experiments, a series of Raman spectra of an aqueous solution of each neurotransmitter in absence of the other neurotransmitters was acquired with the D-SERS nanosensors. A cross-selectivity assay was then performed, in which we counted the number of positive (detection of the neurotransmitter in solution) and false positive (other neurotransmitters) events of every neurotransmitters tested (Fig. 3.3, left panel). Ideal results should show 100% detection events for the neurotransmitters in solution (i.e. 100% DA detection for a DA solution) and near 0% detection for every other neurotransmitter. Results showed a high selectivity toward DA, ATP and glu by the data processing algorithm. ACh and GABA showed some level of crosstalk compared to other neurotransmitters. We also observed a small crosstalk (about 20%) of ACh and DA, and of GABA and glu, leading to a poor selectivity for GABA itself. Even with this reduced selectivity, we integrated ACh and GABA into our data processing, considering that ACh is not secreted by dopaminergic neurons. Consequently, the detection of ACh should be minimal while analysing neurotransmitters secretion from dopaminergic neurons and thus, served as a negative control in our D-SERS experiment. On the other hand, GABA⁴² and glu⁴³ can both be co-released with DA by dopaminergic neurons at a subset of axon terminals. However, the relative levels of GABA and glu release should be significantly lower compared to DA. Despite the partial detection overlap between GABA and ACh, we observed a drastic reduction of false positive events in the optimized chemometric sorting process by allowing a variable number of Raman bands per standard compared to our initial analysis (Fig. 3.3, right panel)³⁹. To further test the selectivity of the data processing algorithm, we explored multiplexed sensing with the D-SERS nanosensor by measuring the number of events in a binary mixture of DA and ATP (Fig. 3.4).

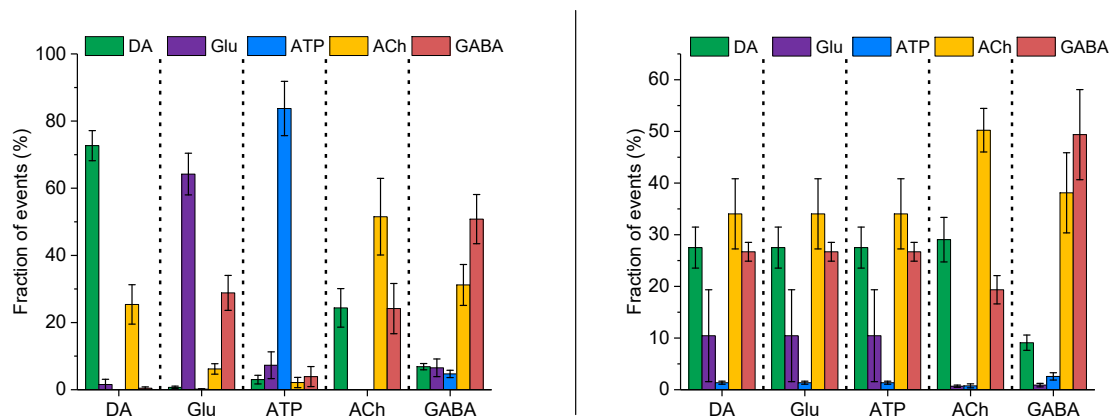


Figure 3.3 Comparison of the cross-selectivity assay of the data processing algorithm of different solutions containing a single standard. The data processing algorithm was set for a variable number of bands per neurotransmitter (optimised algorithm - Left) and an invariable number of bands (Right), clearly demonstrating the necessity of adjusting the data processing algorithm for each neurotransmitter. SERS measurements were performed on eight different nanosensors in a freshly prepared solution in phosphate saline buffer (PBS) pH 7.4 of the corresponding standard (DA, glu, ATP, ACh and GABA) at a concentration of 1 mg/mL. The number of detection events per neurotransmitter was counted for the SERS spectra collected (1000 spectra). We used a 633 nm laser diode at 1 mW with an integration time of 500 ms per spectrum. The error bars correspond to the standard deviation of the mean ($n = 8$ independent experiments).

The binary mixture of DA and ATP showed an asymmetric number of events detected for an equimolar solution. A smaller fraction of events was detected for DA than ATP (Fig. 3.4). This asymmetric number of events for ATP and DA was expected due to the intrinsic difference in surface adsorption of different molecules on the D-SERS nanosensor and thus, on their SERS response. Adsorption of the neurotransmitters to the gold nanoparticles on the D-SERS nanosensor is essential to achieve a sensitive detection since only the molecules located in the proximity of the plasmonic surface will be subjected to the large increase in Raman scattering.²⁷ Different neurotransmitters will exhibit different surface adsorption properties which will impact the acquired SERS spectra. Amine groups are well known for adsorbing to gold surfaces. Consequently, the potential adsorption profiles on a gold electrode were reported for a broad

range of neurotransmitters by Takamura and Kusu.⁴⁴ They found that most neurotransmitters including DA, 5-HT, GABA, glu and ACh adsorbed readily on gold near the potential of zero charge or at slightly positive surface charge. While ATP adsorption profiles were not measured in these exact same conditions, Liu and co-workers recently investigated the adsorption of DNA to gold nanoparticles and demonstrated that the nucleotide's bases were the driving force in DNA stabilized Au NPs suggesting adsorption at more negative surface charge (they investigated citrate-capped Au NPs) for ATP.⁴⁵ In the present experiments, negatively charged gold nanoraspberries were electrostatically adsorbed onto the positively charged borosilicate *patch-clamp* glass to generate the nanosensor. The HEPES-capped nanoraspberries exhibited a ζ -potential of -43.4 ± 0.6 mV at pH 7.4 corresponding to a highly negatively charged surface. The greater ionic strength of the physiological buffer used for neurotransmitter sensing is expected to partially screen the surface charges of the nanoraspberries.

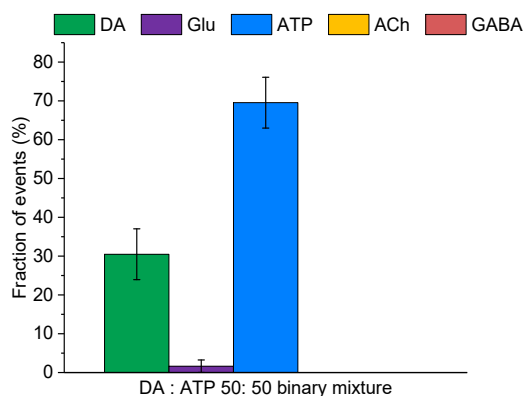


Figure 3.4 Number of events for an equimolar binary mixture of DA and ATP in a solution containing 1 mg/mL of each neurotransmitter evaluated by using variable numbers of bands for every neurotransmitter. The number of detection events per neurotransmitter was counted for the SERS spectra collected (1000 spectra). We used a 633 nm laser diode at 1 mW with an integration time of 500 ms per spectrum. The error bars correspond to the standard deviation of the mean ($n = 4$ independent experiments).

The positively charged *patch-clamp* glass tube used to immobilize the nanoraspberries is also expected to decrease the surface charges of the nanosensor compared to the colloidal suspension. However, both ionic strength and the positive surface charges should not counter

balance all the negative charges of the nanoraspberries leading to a negatively charged Au NP on the nanosensor. Considering these assumptions, it is likely that the lower number of events for DA than ATP could be a result of the weaker adsorption of DA compared to ATP. The cross-selectivity assay and the detection of a binary mixture have shown the capability of both our data processing algorithm and D-SERS nanosensor to selectively detect neurotransmitters in pure solution, and in a simple mixture.

These observations demonstrate the necessity for calibration for each neurotransmitter to provide quantitative estimates of concentration. Several factors will thus need to be taken into account in the calibration model to be developed in the future. The difference in adsorption profiles and SERS intensity of the different neurotransmitters demonstrate the necessity to individually calibrate each neurotransmitter with an independent calibration curve, as normally needed for most analytical techniques. It will also be important to use suitable calibration models. Among the different possibilities, we estimate that a digital counting of the number of events as proposed recently by Brolo *et al.* (conference communication ⁴⁶) or a nonlinear calibration model proposed by Vogt *et al.* ⁴⁷ could be applied to quantify neurotransmitters. Digital counting relies on the number of positive detection events for a molecule, which is suitable for the detection of low concentrations near the detection limit of the technique. Otherwise, a nonlinear calibration would use a polynomial at each Raman shift describing the intensity as a function of concentration. This mathematical model can be extended to multiple analytes using polynomial surfaces of concentration of analytes and spectroscopic output. These models will be investigated in the future.

3.3.2. Combined Raman-fluorescence microscopy and fluidic set up

The application of the D-SERS nanosensors for monitoring neurotransmitter secretion events also required modification of an AFM-Raman microscope. Thus, we developed a combined Raman-fluorescence microscope benefitting from the precise micromanipulator of the atomic force microscope (AFM) in order to locate the nanosensor in close vicinity of the area of interest and to visualize living cells. We thus modified the AFM tip holder of an Alpha300 AFM-Raman microscope (Witec, Ulm, Germany) with a holder suited to secure the patch-clamp-like

nanopipette on the piezoelectric inertial drive usually used to manipulate AFM cantilevers to position the D-SERS nanosensor with sub-micron spatial resolution. DA is secreted from the axonal varicosities of dopaminergic neurons⁴⁸, as well as from the somatodendritic compartment of these neurons. Hence, to maximize the probability of DA sensing, we aimed to position the nanosensor in a region containing an important number of axonal varicosities and dendrites. A combined Raman-fluorescence microscope was therefore necessary for visualisation of the dopaminergic neurons cultured from genetically-modified mice expressing GFP under control of the tyrosine hydroxylase promoter.⁴⁹ This allowed us to accurately position the D-SERS nanosensor near the regions most likely to show high neurotransmitter secretion. A CMOS CCD camera enabling fluorescence measurements in the same field of view as the Raman measurements was mounted on the AFM-Raman microscope using a beamsplitter (Fig. 3.5). Consequently, the combined microscope allowed: (1) fluorescence visualization of the location of dendrites and varicosities of cultured neurons, (2) precise control on the position of the D-SERS nanosensor, and (3) to evaluate the viability of cultured neurons before and after the Raman measurements.

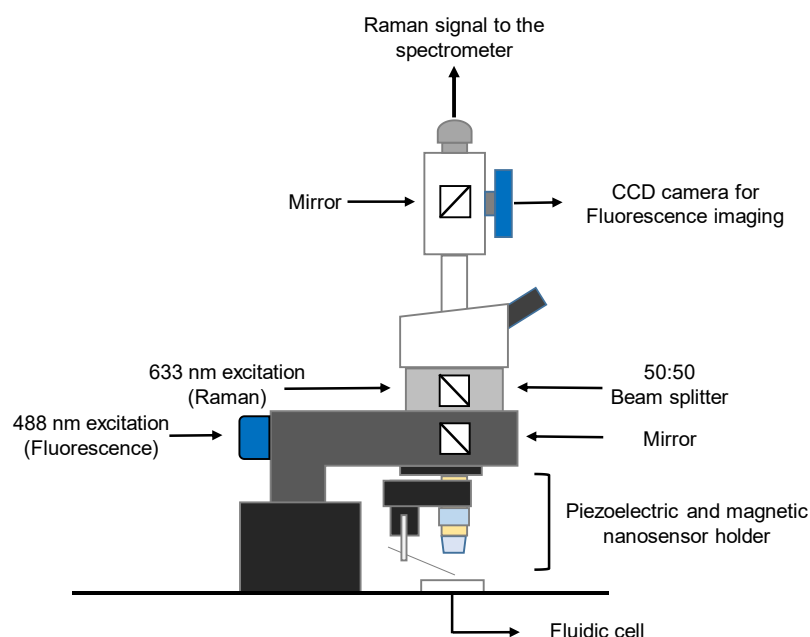


Figure 3.5 Scheme of the combined Raman-Fluorescence microscope developed on a alpha300 from Witec (Ulm, Germany). A 474 nm excitation and 498 nm emission filters were used for fluorescence imaging of the GFP expressing dopaminergic neurons allowing the precise

positioning of the plasmonic nanosensor with a submicron spatial resolution. Raman spectroscopy were performed at 633 nm while focusing on the same area of the nanosensor surface during the entire measurement period. The nanosensor were mounted on a custom magnetic holder and located at the focal plane of the microscope objective with a piezoelectric inertial drive typically used to hold an AFM cantilever.

To maintain the viability of the neurons during the D-SERS experiments, we also developed an open fluidic chamber allowing a constant flux of physiological buffer at room temperature using a peristaltic pump at a constant flow of 35 $\mu\text{L/s}$. The pump enabled simple and rapid exchange of the buffer composition in the fluidic chamber. A 63X water immersion objective allowed the fluorescence and SERS measurements in the open fluidic cell. This set-up is also conducive to multiprobe techniques, such as the ones used for classical electrochemistry and electrophysiology experiments and for optogenetic stimulation of neurons.

3.3.3. Immunocytochemistry and spatially resolved fluorescence imaging.

Physiological experiments often involve the electrical, optical or chemical stimulation of living neurons, followed by a change of neurotransmitter concentration due to release events. As an example corresponding to the proof-of-concept experiment presented in this article, elevated K^+ concentrations was used to stimulate DA release and trigger an increase in its extracellular concentration. Depolarisation can be cycled multiple times and the correlated elevation and decrease in DA concentration during the depolarisation and repolarisation cycles is usually measured. It is also important to maintain morphological integrity of the neuron samples during electrical, optical and chemical stimulation and thus, microscopy is usually performed in combination with physiological experiments. Changes in morphology of the neuron sample can be indicative of damage caused by the experimental manipulation.

To evaluate the viability of neuronal tissues subjected to D-SERS measurements and to ensure that manipulation of the tissue and SERS measurements do not perturb the viability of examined neurons, we performed immunocytochemistry and spatially resolved fluorescence imaging to investigate the health status of the cultured neurons in the area probed in D-SERS

experiments. Immunofluorescence images acquired on a TE 200 fluorescence microscope from Nikon (Tokyo, Japan) revealed no significant differences between control and probed samples (Fig. 3.6 A and B). Both the sample and control neurons showed normal cell morphology including the presence of a large number of dendrites and axonal varicosities. Control neurons were subjected to the same cycles of basal observation and depolarisation/repolarisation, but without exposure of the neurons to the 633 nm laser of the Raman spectroscopy. Thus, we were able to evaluate the quality of the manipulated sample exposed to possible mechanical and physiological stress from the constant flux of physiological buffer and from multiple depolarisation / repolarisation cycles.

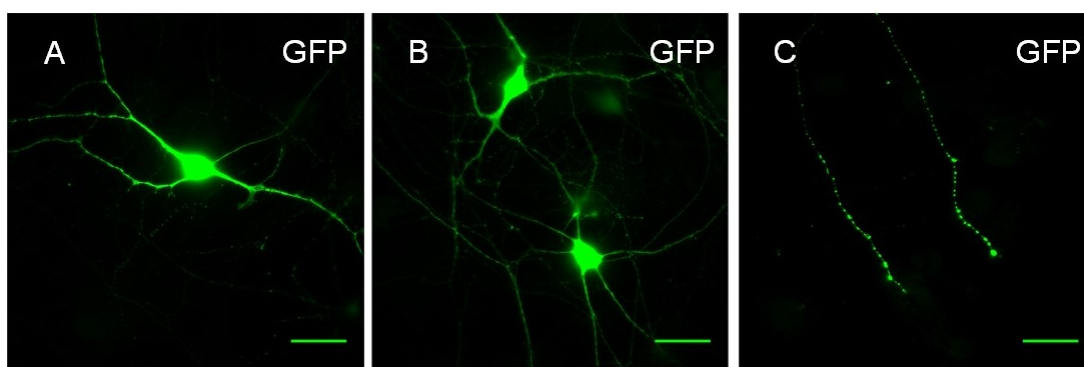


Figure 3.6 Immunocytochemistry fluorescence images of dopaminergic neurons obtained with a TE 200 fluorescence microscope from Nikon (Tokyo, Japan). (A) Randomly selected neurons of a control sample which was not exposed to the 633 nm laser wavelength for SERS experiment. (B) Randomly selected neurons of a sample which was exposed to the 633 nm wavelength throughout the SERS experiment. (C) Axonal varicosities of the control sample corresponding to the site of greatest DA release. Neurons were immunolabelled with chicken anti-GFP primary antibody and detected with Alexa 488 goat anti-chicken secondary antibody to enhance the fluorescence intensity. Fluorescence images were collected with a 60X oil immersion objective with an exposure time of 400 ms. The scale bars of the fluorescence images are 20 μm .

However, these immunofluorescence images were not acquired at exactly the same location to the Raman experiments and only showed the general impact of the exposure to the Raman laser on the sample. Next, we evaluated the local impact of the D-SERS measurements on neurons using combined Raman-fluorescence microscopy by imaging the sample before and

after the SERS experiment. We observed the generation of swellings (vacuoles) along dopaminergic neurons' processes when using a laser power of 1 mW at 633 nm (Fig. 3.7 B), compared to prior to the D-SERS measurements (Fig. 3.7 A). The appearance of these vacuoles is likely to have resulted from cellular damages caused by local heating through plasmonic relaxation⁵⁰ emerging from the high resonance of the localized surface plasmon frequency with the 633 nm laser, or from reactive oxygen species generated by prolonged excitation of GFP expressed by the neurons. However, the generation of vacuoles was significantly reduced or completely absent at a laser power of 500 μ W (Fig. 3.7, C and D). Also, we once again observed no impact on neuronal viability from multiple depolarisation / repolarisation cycles combined with local fluorescence imaging. Hence, we conclude that D-SERS experiments do not induce neuronal damage and confirm the viability of the neurons throughout the entire experiments.

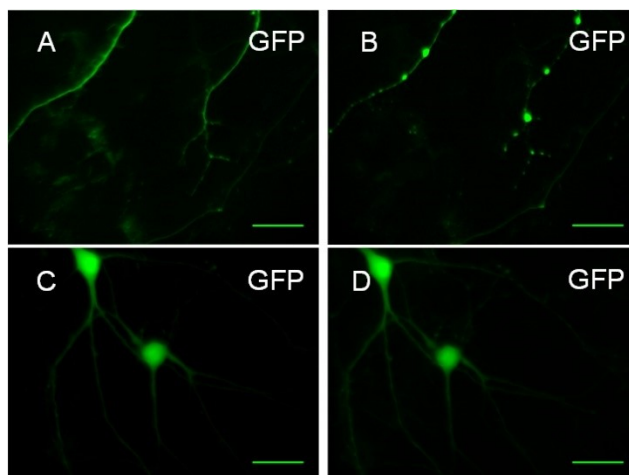


Figure 3.7 Spatially resolved fluorescence imaging with a combined Raman-fluorescence microscope. (Top) Fluorescence images of neuronal processes prior (A) and after (B) the SERS measurements at a laser intensity of 1 mW at 633 nm which led to the generation of multiple swellings along the processes. (Bottom) Fluorescence images of randomly selected neurons (cell bodies and dendrites) prior (C) and after (D) the SERS measurements at a decreased laser power intensity of 500 μ W at 633 nm. The SERS measurement implied a constant illumination onto the nanosensor surface for a period of 10 min. Fluorescence images, corresponding to the fluorescence of GFP, were acquired at 474 nm excitation wavelength and 498 nm emission wavelength using a 63X (NA = 1) water immersive objective. The integration time of

fluorescence was 250 ms. SERS measurements were performed with the same lens. The scale bars of the fluorescence images are 20 μm .

3.3.4. Neurotransmitter monitoring by D-SERS optophysiology:

To demonstrate the potential of this platform for neuroscience experiments, we used D-SERS nanosensors in experiments where dopamine secretion was triggered by depolarisation induced by exchanging the normal physiological buffer containing 5 mM KCl for a depolarizing buffer containing 40 mM KCl. The high concentration of KCl caused membrane depolarisation and triggered the secretion of neurotransmitters. SERS measurements were carried out during 2 cycles, one before and one during depolarisation in order to demonstrate the capability of D-SERS as an optophysiology technique to selectively detect neurotransmitter release. We were able to image and position with sub-micron resolution the D-SERS nanosensor over the cellular processes of dopaminergic neurons using the combined Raman-fluorescence microscope. Neurons were constantly perfused with a fresh physiological buffer during the experiments.

Because dopaminergic neurons are grown as co-cultures with astrocytes⁵¹ that provide a supportive substrate, we next used D-SERS to examine background signals detected in pure astrocyte cultures, without neurons. This control ensured that the response of astrocytes and their behaviour in high potassium concentration did not impact the optical response of the nanosensor and thus, compromised the biological relevance of the results. We evaluated the response of four different nanosensors over four different monolayers of cortical astrocytes in physiological buffer and performed two cycles of depolarisation/recovery with 40 mM KCl physiological buffer (Fig. 3.8, left). Results showed a very low number of events for every neurotransmitter under basal conditions and in response to depolarisation, confirming no interference from the astrocyte monolayer in the detection of neurotransmitters. Based on these results, we expect that most of the signals detected by D-SERS in mixed glial-neuronal cultures originate from neurons. The mean number of neurotransmitter events detected in pure astrocyte cultures were used to correct the number of events detected in neuronal cultures in the subsequent experiments.

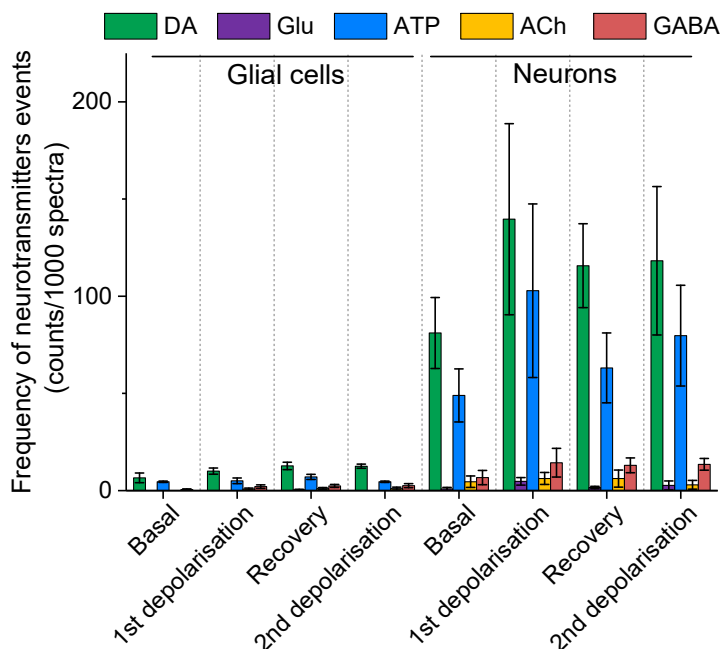


Figure 3.8 Frequency of D-SERS events of different neurotransmitters near primary astrocytes (glial cells) and dopaminergic neurons. Experiments were performed to evaluate the response of the nanosensor with only glial cells in physiological buffer. We performed two cycles of depolarisation/recovery of the glial cells with a physiological buffer containing 40 mM KCl with four different nanosensors near four different cell samples. The mean number of events for each neurotransmitter in normal physiological buffer established the baseline and experiments with neurons were corrected according to these values. Experiments were then performed with five different nanosensors near five dopaminergic neurons samples during two cycles of depolarisation/recovery with the same buffers. The nanosensor was positioned 10 μm above a region containing a high density of dendrites and axonal varicosities and its position was held constant during the experiments. We used a 633 nm laser diode at 500 μW with an integration time of 250 ms per spectrum for these experiments. Depolarisation was triggered with 40 mM KCl physiological buffer while recovery was achieved in normal KCl physiological buffer. Number of spectra acquired for both baseline and recovery was 3000 spectra (750 seconds) while 2000 spectra (500 seconds) were acquired for both depolarisations. The error bars correspond to the standard deviation of the mean ($n = 4$ experiments for glial cells, $n = 5$ experiments for neurons).

We next investigated the secretion of neurotransmitters in five independent dopaminergic neuron primary cultures by D-SERS with five different but identically prepared nanosensors (Fig. 3.8, right). We observed an important number of events for DA and ATP, and a small number of events for GABA, with little if any signal for glu in dopaminergic neuron cultures compared to glial cell cultures. A series of SERS spectra is provided in Figure 3.9. In basal conditions and prior to depolarisation, dopaminergic neurons sporadically secreted DA, an observation expected because of the fact that dopaminergic neurons are autonomous pacemakers, spontaneously firing at a frequency between 2 and 5 Hz.⁵² The secretion of DA was accompanied with secretion of ATP, compatible with recent work suggesting that subsets of dopaminergic neurons can package and release this nucleotide.⁵³ Although a low number of events were detected for ACh, these are likely to be due to interferences related to other neurotransmitters, like DA and GABA, as suggested by our cross-selectivity results.

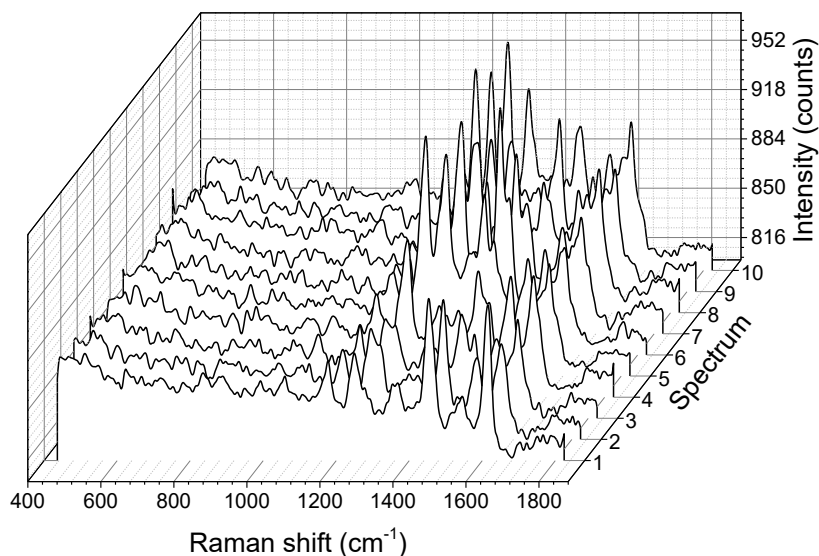


Figure 3.9 Series of 10 consecutively acquired D-SERS spectra during depolarisation experiments showing the raw spectral data recorded in close proximity to neurons in physiological experiments.

In response to membrane depolarisation with 40 mM KCl buffer, we observed a tendency towards an increase in the absolute number of events for both DA and ATP (paired *t*-

test, $p = 0.2116$, $n = 5$), while no events were detected for glu and only a limited number for GABA. The neurons were then repolarised by returning to a physiological buffer containing 4 mM KCl, causing a decrease in the absolute number of events for every neurotransmitter. By comparing the events detected before and during membrane depolarisation, we found an overall change of 1.7 fold in the number of DA events detected by D-SERS. Finally, we performed a second depolarisation in order to evaluate the repeatability of the secretion process. Analysis of D-SERS signals revealed an increase in the absolute number of positive events for DA and ATP during both the first and second depolarisations compared to basal and repolarisation conditions (Fig. 3.10). There was a tendency for a decrease of the absolute number of events triggered by the second depolarisation cycle compared to the first (Fig. 3.8, right). Also, an ANOVA performed on the number of event of DA during the basal, 1st depolarisation, repolarisation and 2nd depolarisation failed to reach significance ($p = 0.3082$, $n = 5$). It should be noted that these results were obtained on a series of neurons with different SERS sensors, perhaps contributing to data variability. Improvements of the reproducibility of the sensors will be needed to provide confirmatory results.

During the experiment, we used an open fluidic chamber containing a volume of 700 μL and in which we perfused the corresponding physiological buffer at a constant rate of 35 $\mu\text{L/s}$. To trigger the depolarisation, the neurons were exposed to the depolarisation buffer for a period of eight minutes while recovery was performed in normal KCl buffer for a period of 12 min. The incomplete recovery of the number of events after the first depolarisation could perhaps be also due to the long duration and non-physiological nature of the membrane depolarisation. Likewise, the decrease in number of events for the second depolarisation compared to the first could result from an incomplete recovery of membrane potential following such a lengthy membrane depolarisation. In these experiments, we failed to detect glu release near dopaminergic neurons. This may be surprising considering the known capacity of a subset of these neurons to use glutamate as cotransmitter.^{17, 54} One possibility is that the positioning of the D-SERS nanosensor, randomly located along the neurons' axonal varicosities, was not close enough to glutamate release sites, which are synaptic in nature.⁵⁵

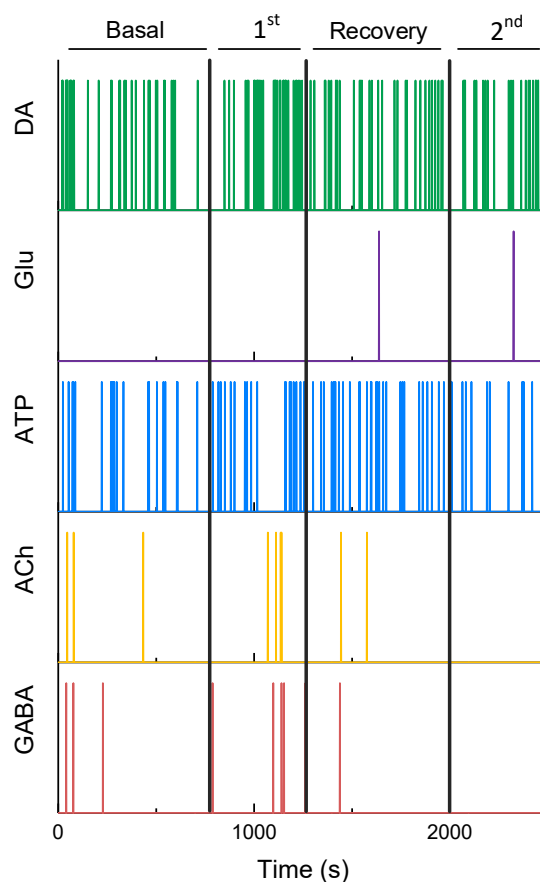


Figure 3.10 D-SERS optophysiology curves for DA, glu, ATP, ACh and GABA detected near dopaminergic neurons. The time trace corresponds to a single analysis of one neuron. Vertical bars correspond to the assignment of a positive event for the corresponding neurotransmitter based on the chemometric data treatment algorithm in optimized conditions. The D-SERS optophysiology curves showed 4 distinct regions corresponding to the basal, first depolarisation, recovery and second depolarisation, respectively. Basal measurements were performed in physiological buffer containing 4 mM KCl while secretion was triggered by a depolarizing buffer containing 40 mM KCl. SERS measurements were performed at 633 nm at a laser power of 500 μ W. The integration time was 250 ms.

Our current results demonstrate the applicability of D-SERS in actual physiological experiments. While the results showed the expected increase in number of events detected in response to membrane depolarisation, only partial recovery was obtained after return to normal

membrane potential, suggesting that the reproducibility of the SERS experiments remains to be improved. The use of shorter periods of membrane depolarisation or electrical or optogenetic stimulation to mimic more physiological stimuli is likely to improve cell recovery and reproducibility. It will also be important to continue improving the development of highly reproducible and sensitive nanosensors in order to detect changes in local neurotransmitter concentrations with a large dynamic range. The nanosensors currently used were random arrays of gold nanoraspberries immobilized on a nanometric sized patch-clamp-style glass pipette. The randomness of the arrays led to an important variation in Au NP density and variable number of clusters in the focal area of the laser, thus to variable sensitivity between nanosensors. We are thus optimising the nanosensor fabrication process in order to further enhance sensitivity and reproducibility to fully harvest the potential of the technique. In addition, we must also consider the inherent variability due to the positioning of the sensor close to neuronal processes that were expected to possess neurotransmitter release sites. Improved positioning of the sensor using fluorescent or genetically-encoded indicators of exocytosis might reduce variability.

3.4. Conclusion

In summary, we report on the development of a D-SERS methodology for monitoring the secretion of neurotransmitters. We optimized a chemometric data processing algorithm to sort with high sensitivity and selectivity DA, glu, ATP, ACh and GABA in order to investigate their secretion *in vitro* by neurons. We developed a combined Raman-fluorescence microscope to visualize and position the plasmonic nanosensor with sub-micron spatial resolution above GFP-expressing dopaminergic neurons to locally detect the neurotransmitters. We successfully used D-SERS to detect neurotransmitters secreted by neurons under basal conditions and in an activity-dependent manner in response to membrane depolarisation. By developing more sensitive nanosensors, D-SERS optophysiology has the capacity for multiplexed detection of different neurotransmitters *in vitro* with high selectivity. This technology has high potential to be applied in bioscience and could have a major impact in neuroscience in particular by allowing sensitive and selective sensing of a broad range of neurotransmitters *in vitro* and perhaps *in vivo*.

3.5. Experimental details

Unless otherwise indicated, chemicals were bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and used without further purification.

3.5.1. Nanoparticle synthesis

Prior to the nanoparticles synthesis, all glassware were cleaned with *Aqua regia* (3:1 HCl:HNO₃). *Caution, Aqua regia is highly corrosive!* Nanoraspberries were synthesized by adding 100 μ L of a 250 mM HAuCl₄ · 3 H₂O to 100 mL of water and 6.25 mL of a freshly prepared 100 mM HEPES aqueous solution at room temperature and stirred overnight. The Au nanoparticle suspension was then centrifuged at 11,000 rpm for 2 min and washed twice with water.

3.5.2. Nanosensor fabrication and functionalization

Borosilicate glass capillaries (1 mm outer diameter, 0.5 mm inner diameter, 10 cm length) from Sutter Instrument (Novato, CA) were pulled with a P-2000 laser based micropipette puller from Sutter Instrument with the following parameters: Stage 1) Heat: 280, Filament: 3, Velocity: 15, Delay: 145, Pull: 20; Stage 2) Heat: 425, Filament: 0, Velocity: 15, Delay: 128, Pull: 200. As previously reported, these parameters resulted in nanopipettes of nearly 500 nm diameter and 13° cone angle.³⁴ *Note that different instruments may require slightly different values of these parameters to obtain equivalent nanopipettes.* Using a custom-designed Teflon holder, the pulled capillaries were immersed upside down in a 3:1 H₂SO₄:H₂O₂ piranha solution (*Caution, piranha solution is extremely corrosive and reacts violently with organic compounds!*) for 90 min and rinsed thoroughly with water and finally with anhydrous ethanol. The pulled capillaries were then reacted in a freshly prepared solution of 0.3% APTES in anhydrous ethanol for 30 min with constant stirring. Afterward, the pulled capillaries were rinsed with anhydrous ethanol and sonicated in ethanol for 1 minute. The pulled capillaries were heated at 120 °C for 30 min and cooled at room temperature before storage. The pulled capillaries were then functionalized in a solution of freshly prepared gold nanoraspberries (A₆₀₀

$I_{\text{nm}} = 0.35$ A.U.) for 90 min without stirring. At this point, the pulled capillaries were referred to as SERS nanosensors. Scanning electron microscopy (SEM) images of the SERS nanosensors were acquired on a JEOL JSM-7400F high-resolution field emission scanning electron microscope (Tokyo, Japan) using a potential of 1.5 kV.

3.5.3. Animals

Transgenic mice expressing the eGFP gene in monoaminergic neurons under control of the tyrosine hydroxylase promoter (TH-eGFP) were used in this study.⁴⁹ Experimental protocols were approved by the animal handling and ethics committee (CDEA) at the Université de Montréal. Housing was at a constant temperature (21°C) and humidity (60%), under a fixed 12 hours light/dark cycle, with free access to food and water.

3.5.4. Primary Neuronal Cultures

P0-P2 mice were cryoanesthetized and decapitated for tissue collection. Freshly dissociated cells from the mesencephalon were prepared and then plated (250 000 cells/mL) on glass coverslips containing a monolayer of cortical astrocytes as described previously.⁵¹ Cells were incubated in 5% CO₂ and then used after 10 days *in vitro* for the D-SERS experiments.

3.5.5. Immunostaining and image acquisitions

Cultures were fixed with a PBS solution containing 4% paraformaldehyde for 30 min and then permeabilized for 20 min in PBS solution containing 0.1% Triton X-100 and 0.02% NaN₃. Nonspecific sites were blocked in the same solution supplemented with 5% of goat serum and 1% bovine serum albumin. Chicken anti-GFP primary antibodies (1:2000; Avès Lab #GFP-1020) detected with an Alexa 488 goat anti-chicken secondary antibody (1:500; Molecular Probes) were incubated overnight and 1 hour respectively, all at room temperature. Then, two or three dopaminergic neurons were randomly selected per coverslip and fluorescence images were acquired on a TE 200 fluorescence microscope from Nikon (Tokyo, Japan) equipped with

a Hamamatsu flash 4.0 v2 camera (Hamamatsu, Japan) and a 60X oil immersion objective. Image acquisition was controlled and processed with Micromanager software.⁵⁶

3.5.6. SERS measurements

Raman measurements were performed on an Alpha300 AFM-optical microscope from Witec (Ulm, Germany) using a 63x water immersive objective (NA = 1) from Zeiss (Oberkochen, Germany) with a 633 nm laser diode from OZ Optics (Ottawa, Canada). A 250 μm multimode optical fiber was used to collect the Raman signal, which was dispersed by a 600 lines/mm grating of a Spectra2300i from Princeton Instrument (Acton, MA). The Raman spectra were acquired with a 1024 x 1024 imaging CCD camera from Andor Technology (Belfast, Northern Ireland). We modified the optical microscope by adding a reflective lens in the infinite optical pathway of the microscope on which a CMOS CCD camera AxioCam 503, from Zeiss (Oberkochen, Germany) was mounted to allow fluorescence imaging. Fluorescence images were acquired by using a Xe arc lamp Xcite from Lumen Dynamic (Mississauga, Canada) with a 474/27 nm Brightright filter from Semrock (Rochester, NY) for excitation and a 498 nm RazerEdge filter from Semrock (Rochester, NY) for emission. The nanosensor was mounted on a custom-made magnetic holder, similar to an AFM cantilever holder. The magnetic holder was then magnetically attached to a piezoelectric inertial drive mounted on a support above the microscope objective. The inertial drive is usually used to hold an AFM cantilever. D-SERS measurements from neurons were performed in a custom-made Teflon fluidic cell with a constant flux of physiological buffer provided by a Minipuls 2 peristaltic pump from Gilson, Inc. (Middleton, WI). The flux of buffer was of 50 μL per second and the approximate total volume of the cell was of 700 μL .

All measurements with neurons were obtained in a normal saline physiological buffer composed of 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 6 mM sucrose and 10 mM glucose. Neurotransmitter secretion was triggered with a 40 mM KCl solution. The depolarisation buffer was composed of 105 mM NaCl, 40 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 6 mM sucrose and 10 mM glucose. Both buffers were adjusted to pH 7.35 and to an osmolarity between 305-310 mOsm.

Dynamic SERS data analysis was performed with a custom chemometric algorithm on MatLab (MathWorks, MA). Fluorescence imaging was performed with Zen blue edition from Zeiss (Oberkochen, Germany). Fluorescence data analysis was carried out with Fiji.⁵⁷ ANOVA was performed on GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, Inc., CA).

3.6. Acknowledgements

The authors would like to thank Jean-Antoine Gauthier-Cyr, Hu Zhu and Geraldine Bazuin of Université de Montréal, and Mélina Drouin and Denis Boudreau of Université Laval for fruitful discussions about the SERS experiments. The authors thank financial support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Fonds de Recherche du Québec – Nature et technologies (FRQ-NT) and of the Canada Foundation for Innovation (CFI). Research in the Trudeau lab was supported by grants from CIHR and from the Brain Canada and Krembil Foundations.

3.7. References

1. Janezic, S.; Threlfell, S.; Dodson, P. D.; Dowie, M. J.; Taylor, T. N.; Potgieter, D.; Parkkinen, L.; Senior, S. L.; Anwar, S.; Ryan, B.; Deltheil, T.; Kosillo, P.; Cioroch, M.; Wagner, K.; Ansorge, O.; Bannerman, D. M.; Bolam, J. P.; Magill, P. J.; Cragg, S. J.; Wade-Martins, R., Deficits in Dopaminergic Transmission Precede Neuron Loss and Dysfunction in a New Parkinson Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110* (42), E4016-E4025.
2. Weinshenker, D., Functional Consequences of Locus Coeruleus Degeneration in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* **2008**, *5* (3), 342-345.
3. Jacobsen, J. P. R.; Medvedev, I. O.; Caron, M. G., The 5-HT Deficiency Theory of Depression: Perspectives from a Naturalistic 5-HT Deficiency Model, the Tryptophan Hydroxylase 2(Arg)439(His) Knockin Mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2012**, *367* (1601), 2444-2459.
4. Bucher, E. S.; Wightman, R. M., Electrochemical Analysis of Neurotransmitters. In *Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 8*, Cooks, R. G.; Pemberton, J. E., Eds. 2015; Vol. 8, pp 239-261.

5. Wightman, R. M.; Strope, E.; Plotsky, P. M.; Adams, R. N., Monitoring of Transmitter Metabolites by Voltammetry in Cerebrospinal-Fluid Following Neural Pathway Stimulation. *Nature* **1976**, 262 (5564), 145-146.
6. Mosharov, E. V.; Sulzer, D., Analysis of Exocytotic Events Recorded by Amperometry. *Nat. Methods* **2005**, 2 (9), 651-658.
7. Robinson, D. L.; Hermans, A.; Seipel, A. T.; Wightman, R. M., Monitoring Rapid Chemical Communication in the Brain. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (7), 2554-2584.
8. Reinhoud, N. J.; Brouwer, H.-J.; van Heerwaarden, L. M.; Korte-Bouws, G. A. H., Analysis of Glutamate, GABA, Noradrenaline, Dopamine, Serotonin, and Metabolites Using Microbore UHPLC with Electrochemical Detection. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4 (5), 888-894.
9. Wightman, R. M., Voltammetry with Microscopic Electrodes in New Domains. *Science* **1988**, 240 (4851), 415-420.
10. Gonon, F. G.; Navarre, F.; Buda, M. J., In Vivo Monitoring of Dopamine Release in the Rat-Brain with Differential Normal Pulse Voltammetry. *Anal. Chem.* **1984**, 56 (3), 573-575.
11. Pothos, E. N.; Davila, V.; Sulzer, D., Presynaptic Recording of Quanta from Midbrain Dopamine Neurons and Modulation of the Quantal Size. *J. Neurosci.* **1998**, 18 (11), 4106-4118.
12. Cheer, J. F.; Heien, M.; Garris, P. A.; Carelli, R. M.; Wightman, R. M., Simultaneous Dopamine and Single-Unit Recordings Reveal Accumbens GABAergic Responses: Implications for Intracranial Self-Stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102 (52), 19150-19155.
13. Rodeberg, N. T.; Sandberg, S. G.; Johnson, J. A.; Phillips, P. E. M.; Wightman, R. M., Hitchhiker's Guide to Voltammetry: Acute and Chronic Electrodes for in Vivo Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8 (2), 221-234.
14. Zhang, F.; Tsai, H.-C.; Airan, R. D.; Stuber, G. D.; Adamantidis, A. R.; de Lecea, L.; Bonci, A.; Deisseroth, K., Optogenetics in Freely Moving Mammals: Dopamine and Reward. *Cold Spring Harb Protoc* **2015**, 2015 (8), 715-24.
15. Chen, G. Y.; Ewing, A. G., Chemical Analysis of Single Cells and Exocytosis. *Crit. Rev. Neurobiol.* **1997**, 11 (1), 59-90.

16. Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaître, F., Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion: Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2585-2621.
17. El Mestikawy, S.; Wallen-Mackenzie, A.; Fortin, G. M.; Descarries, L.; Trudeau, L.-E., From Glutamate Co-Release to Vesicular Synergy: Vesicular Glutamate Transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12* (4), 204-216.
18. Kneipp, K.; Wang, Y.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Near-Infrared Surface-Enhanced Raman-Scattering (NIR-SERS) of Neurotransmitters in Colloidal Silver Solutions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **1995**, *51* (3), 481-487.
19. Dijkstra, R. J.; Scheenen, W. J. J. M.; Dam, N.; Roubos, E. W.; ter Meulen, J. J., Monitoring Neurotransmitter Release Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Neurosci. Methods* **2007**, *159* (1), 43-50.
20. Song, P.; Guo, X.; Pan, Y.; Wen, Y.; Zhang, Z.; Yang, H., SERS and In Situ SERS Spectroelectrochemical Investigations of Serotonin Monolayers at a Silver Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *688*, 384-391.
21. Castro, J. L.; SanchezCortes, S.; Ramos, J. V. G.; Otero, J. C.; Marcos, J. I., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Gamma-Aminobutyric Acid on Silver Colloid Surfaces. *Biospectroscopy* **1997**, *3* (6), 449-455.
22. Peica, N.; Lehene, C.; Leopold, N.; Schluecker, S.; Kiefer, W., Monosodium Glutamate in its Anhydrous and Monohydrate Form: Differentiation by Raman Spectroscopies and Density Functional Calculations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2007**, *66* (3), 604-615.
23. O'Neal, P. D.; Cote, G. L.; Motamedi, M.; Chen, J.; Lin, W. C., Feasibility Study Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Quantitative Detection of Excitatory Amino Acids. *J Biomed Opt* **2003**, *8* (1), 33-39.
24. Siek, M.; Kaminska, A.; Kelm, A.; Rolinski, T.; Holyst, R.; Opallo, M.; Niedzioka-Jonsson, J., Electrodeposition for Preparation of Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering-Active Silver Nanoparticle Substrates for Neurotransmitter Detection. *Electrochim. Acta* **2013**, *89*, 284-291.
25. Monfared, A. M. T.; Tiwari, V. S.; Trudeau, V. L.; Anis, H., Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy for the Detection of Glutamate and gamma-Aminobutyric Acid in Serum by Partial Least Squares Analysis. *IEEE Photonics J.* **2015**, *7* (3).

26. Wang, P.; Xia, M.; Liang, O.; Sun, K.; Cipriano, A. F.; Schroeder, T.; Liu, H.; Xie, Y.-H., Label-Free SERS Selective Detection of Dopamine and Serotonin Using Graphene-Au Nanopyramid Heterostructure. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (20), 10255-10261.
27. Bailey, M. R.; Martin, R. S.; Schultz, Z. D., Role of Surface Adsorption in the Surface-Enhanced Raman Scattering and Electrochemical Detection of Neurotransmitters. *J Phys Chem C* **2016**, *120* (37), 20624-20633.
28. An, J. H.; Lee, K.-J.; Choi, J.-W., Gold Nanoparticles-Based Barcode Analysis for Detection of Norepinephrine. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12* (2), 357-365.
29. Xing, Y.; Wyss, A.; Esser, N.; Dittrich, P. S., Label-free Biosensors Based on In Situ Formed and Functionalized Microwires in Microfluidic Devices. *Analyst* **2015**, *140* (23), 7896-7901.
30. Park, S.-G.; Ahn, M.-S.; Oh, Y.-J.; Kang, M.; Jeong, Y.; Jeong, K.-H., Nanoplasmonic Biopatch for in vivo Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Biochip J.* **2014**, *8* (4), 289-294.
31. El-Said, W. A.; Choi, J.-W., In-situ Detection of Neurotransmitter release From PC12 Cells Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2014**, *19* (6), 1069-1076.
32. Dipalo, M.; Messina, G. C.; Amin, H.; La Rocca, R.; Shalabaeva, V.; Simi, A.; Maccione, A.; Zilio, P.; Berdondini, L.; De Angelis, F., 3D Plasmonic Nanoantennas Integrated With MEA Biosensors. *Nanoscale* **2015**, *7* (8), 3703-3711.
33. O'Neal, D. P.; Motamedi, M.; Chen, J.; Cote, G. L., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Near Real-Time Diagnosis of Brain Trauma in Rats. In *Biomedical Spectroscopy: Vibrational Spectroscopy and Other Novel Techniques*, MahadevanJansen, A.; Puppels, G. J., Eds. 2000; Vol. 3918, pp 191-196.
34. Masson, J.-F.; Breault-Turcot, J.; Faid, R.; Poirier-Richard, H.-P.; Yockell-Lelièvre, H.; Lussier, F.; Spatz, J. P., Plasmonic Nanopipette Biosensor. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (18), 8998-9005.
35. Niu, J. J.; Schrlau, M. G.; Friedman, G.; Gogotsi, Y., Carbon Nanotube-Tipped Endoscope for In Situ Intracellular Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Small* **2011**, *7* (4), 540-545.

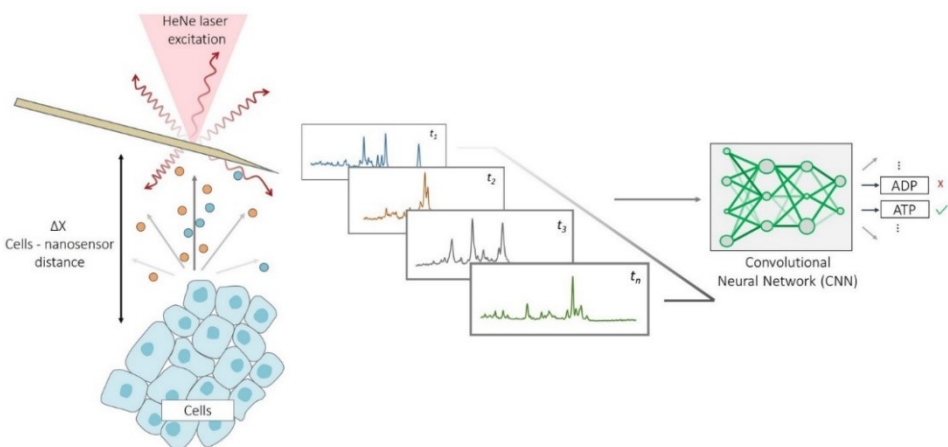
36. Vitol, E. A.; Orynbayeva, Z.; Bouchard, M. J.; Azizkhan-Clifford, J.; Friedman, G.; Gogotsi, Y., In Situ Intracellular Spectroscopy with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)-Enabled Nanopipettes. *ACS Nano* **2009**, 3 (11), 3529-3536.
37. Yan, R. X.; Park, J. H.; Choi, Y.; Heo, C. J.; Yang, S. M.; Lee, L. P.; Yang, P. D., Nanowire-Based Single-Cell Endoscopy. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7, 191.
38. Bailo, E.; Deckert, V., Tip-enhanced Raman scattering. *Chem Soc Rev* **2008**, 37 (5), 921-930.
39. Lussier, F.; Brulé, T.; Vishwakarma, M.; Das, T.; Spatz, J. P.; Masson, J.-F., Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events. *Nano Lett.* **2016**, 16 (6), 3866-3871.
40. Patel, I. S.; Premasiri, W. R.; Moir, D. T.; Ziegler, L. D., Barcoding Bacterial Cells: a SERS-Based Methodology for Pathogen Identification. *J Raman Spectrosc* **2008**, 39 (11), 1660-1672.
41. Kim, M. H.; Yoon, H.; Choi, S. H.; Zhao, F.; Kim, J.; Song, K. D.; Lee, U., Miniaturized and Wireless Optical Neurotransmitter Sensor for Real-Time Monitoring of Dopamine in the Brain. *Sensors* **2016**, 16 (11).
42. Tritsch, N. X.; Ding, J. B.; Sabatini, B. L., Dopaminergic Neurons Inhibit Striatal Output Through Non-Canonical Release of GABA. *Nature* **2012**, 490 (7419), 262-+.
43. Stuber, G. D.; Hnasko, T. S.; Britt, J. P.; Edwards, R. H.; Bonci, A., Dopaminergic Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *J. Neurosci.* **2010**, 30 (24), 8229-8233.
44. Takamura, K.; Kusu, F., Surface Behavior of Neurotransmitters, Their Agonists and Antagonists on a Gold Electrode Surface. *J. Electrochem. Soc.* **1990**, 137 (7), 2132-2135.
45. Zhang, X.; Servos, M. R.; Liu, J., Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, 28 (8), 3896-3902.
46. Brolo, A., Conference presentation: Using SERS for Ultra-Low Concentration Analysis: A Statistical Approach. In *Extreme Biosensing Conference*, Maui, HI, 2015.
47. Ogburn, Z. L.; Vogt, F., Microalgae as Embedded Environmental Monitors. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 954, 1-13.
48. Fortin, G. M.; Bourque, M.-J.; Mendez, J. A.; Leo, D.; Nordenankar, K.; Birgner, C.; Arvidsson, E.; Rymar, V. V.; Berube-Carriere, N.; Claveau, A.-M.; Descarries, L.; Sadikot, A.

- F.; Wallen-Mackenzie, A.; Trudeau, L.-E., Glutamate Corelease Promotes Growth and Survival of Midbrain Dopamine Neurons. *J. Neurosci.* **2012**, *32* (48), 17477-17491.
49. Matsushita, N.; Okada, H.; Yasoshima, Y.; Takahashi, K.; Kiuchi, K.; Kobayashi, K., Dynamics of Tyrosine Hydroxylase Promoter Activity During Midbrain Dopaminergic Neuron Development. *J. Neurochem.* **2002**, *82* (2), 295-304.
50. Huang, X.; El-Sayed, M. A., Plasmonic Photo-Thermal Therapy (PPTT). *Alexandria J. Med.* **2011**, *47* (1), 1-9.
51. Fasano, C.; Thibault, D.; Trudeau, L.-É., Culture of Postnatal Mesencephalic Dopamine Neurons on an Astrocyte Monolayer. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2008**, *44* (1), 3.21.1-3.21.19.
52. Pacelli, C.; Giguere, N.; Bourque, M.-J.; Levesque, M.; Slack, R. S.; Trudeau, L.-E., Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr. Biol.* **2015**, *25* (18), 2349-2360.
53. Ho, T.; Jobling, A. I.; Greferath, U.; Chuang, T.; Ramesh, A.; Fletcher, E. L.; Vessey, K. A., Vesicular Expression and Release of ATP From Dopaminergic Neurons of the Mouse Retina and Midbrain. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*.
54. Dal Bo, G.; St-Gelais, F.; Danik, M.; Williams, S.; Cotton, M.; Trudeau, L. E., Dopamine Neurons in Culture Express VGLUT2 Explaining Their Capacity to Release Glutamate at Synapses in addition to Dopamine. *J. Neurochem.* **2004**, *88* (6), 1398-1405.
55. Berube-Carriere, N.; Riad, M.; Dal Bo, G.; Levesque, D.; Trudeau, L. E.; Descarries, L., The Dual Dopamine-Glutamate Phenotype of Growing Mesencephalic Neurons Regresses in Mature Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* **2009**, *517* (6), 873-891.
56. Edelstein, A. D.; Tsuchida, M. A.; Amodaj, N.; Pinkard, H.; Vale, R. D.; Stuurman, N., Advanced Methods of Microscope Control Using µManager Software. *2014* **2014**.
57. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth* **2012**, *9* (7), 676-682.

4. Machine Learning Driven SERS Optophysiology Reveals Multiplexed Metabolite Gradients Near Cells*

4.1. Abstract

The extracellular environment is a complex medium in which cells secrete and consume metabolites.



Molecular gradients are thereby created near cells, triggering various biological and physiological responses. However, investigating these molecular gradients remain challenging since current tools are ill-suited, provide poor temporal and spatial resolution while also being destructive. Herein, we report the development and application of a machine learning approach in combination with a surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) nanoprobe to measure simultaneously the gradients of at least eight metabolites *in vitro* nearby different cell lines. We found significant increase in secretion, or consumption of lactate, glucose, ATP, glutamine and urea within 20 microns from the cells surface compared to the bulk. We also observed that cancerous cells (HeLa) compared to fibroblast (REF52) have a greater glycolytic rate, expected by this phenotype. Endothelial (HUVEC) and HeLa cells exhibited significant increase in extracellular ATP compare to the control, shining light on the implication of extracellular ATP within the cancer local environment. Machine-learning driven SERS optophysiology is

* Publié en tant qu'article dans *ACS Nano* : Lussier, F., Missirlis, D., Spatz, J., P., Masson J.-F., *ACS Nano*, **2019**, 13, 1403-1411. D.M. a effectué les différentes cultures cellulaires et J.P.S a offert l'accès à ces laboratoires en Allemagne, ainsi que son expertise pour la culture des cellules REF52, HUVEC et HeLa.

generally applicable to metabolites involved in cellular processes, providing a general platform to study cell biology

4.2. Introduction

Cells secrete extracellular metabolites to govern and regulate multiple cellular functions throughout their lifecycle. As an example, eukaryotic cells move along molecular concentration gradient using chemotaxis.¹ This sensing mechanism exhibited by living cells is essential for a plethora of biochemical processes such as recruitment of inflammatory cells to infectious sites and wound healing.²⁻³ Also, molecular gradients are linked to important concepts in developmental biology such as cell patterning, where cellular differentiation is induced by the morphogens gradient, whose concentration encodes the positional information essential for living cells to adopt various fates during their development.⁴⁻⁵ In cancer, the chemotaxis pathways may be reprogrammed to stimulate tumor cells dissemination.⁶ In order to successfully metastasize, cancer cells must invade through neighboring endothelium cells to enter blood vessels (intravasate), circulate within blood stream, and exits the blood vessel (extravasate) to finally grow at a different location.⁷ Chemotaxis is thought to be highly involved in each of these crucial steps which ultimately led to metastasis. Quantifying molecular gradients concentration changes is thus of great interest in biological sciences and cancer research in order to obtain a global understanding of cellular functions and cancer metabolism.

However, monitoring metabolite gradients remains very challenging. Different approaches have been developed to monitor changes of the cellular secretome such as single cell capillary electrophoresis (CE)⁸, mass spectrometry (MS)⁹⁻¹⁰, and various optical sensors based on fluorescence.¹¹⁻¹³ Nevertheless, these contemporary methods required microsampling or lack multiplexing to capture the complex changes in metabolite profiles in the cellular environment (see SI for discussion). Alternatively, surface enhanced Raman scattering (SERS) is ideally suited for multiplex sensing with sensitivity down to the single molecule level.¹⁴ Nanosensors decorated with SERS-active nanoparticles on a pulled fiber or pipette, which can be accurately positioned close or within cells, were proposed to locally investigate intra- or extra-cellular molecules.¹⁵⁻¹⁶ Based on this concept, SERS optophysiology was recently

introduced for providing temporal information about metabolites near cells¹⁷ and neurons¹⁸ by continuously acquiring SERS spectra in time.

SERS optophysiology holds great potential to monitor molecular gradients with high spatiotemporal resolution. As such, SERS optophysiology was applied to semi-quantitatively monitor pyruvate and lactate within a few hundreds of microns of MDCKII cells.¹⁷ However, spatial resolution must be further improved, which is addressed here by using a highly precise piezo stage to manipulate the SERS nanosensor. The first SERS optophysiology experiments were also limited by the data processing method based on generating a unique barcode for each metabolite. This method was simple to implement, but it did not consider the variety of possible SERS spectra in the single-molecule regime in which SERS optophysiology operates, leading to selectivity on the order of 50% to 70%¹⁷ (see SI for further discussion).

We report here the power of artificial neural network (ANN), a flexible supervised machine learning approach¹⁹⁻²⁰, to assign multiple spectra to the same metabolites. The application of ANN allowed us to extract various features in the SERS spectra associated to the different orientations molecules can adopt on the SERS nanosensors, characteristic of specific metabolites. ANN significantly improved the generation of the SERS spectral database and increased the number of metabolites sensed, the sensitivity and the selectivity. Herein, we show that this machine learning-driven molecular sensor using non-destructive and label-free SERS optophysiology and an ANN detects gradients, in a single experiment, of at least 8 important cell metabolites near cancer, healthy and control cells.

4.3. Results and discussion

A series of biologically relevant metabolites were chosen to be included in our supervised learning model in order to characterize their changes near cells. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) acts as an intra- or extracellular chemical messenger involved in physiological pathways such as neurotransmission²¹⁻²² and cellular motility.²³ ATP is also the universal and central molecule associated with metabolic energy within living cells.¹² Monitoring the extracellular ATP concentration changes thus hold promising medical

applications by shedding light on chronic inflammatory diseases, cancer²⁴ and for monitoring other cellular functions. As a source of energy, glucose is converted to lactate with an important glycolytic rate in cancerous cells, generalized by the Warburg effect²⁵, conferring cancer cells the ability to sustain important cell growth and division when glucose is sufficiently abundant.²⁶⁻
²⁷ Nitrogen supply for biosynthesis and cellular homeostasis is provided by extracellular glutamine.²⁸ These metabolites were thus included in the model since they provide highly valuable information regarding cellular metabolism which can be measured extracellularly while being minimally invasive.

Analysis of molecular spectra remains a bottleneck for multiplexing the response of sensors. Most approaches are based on the analysis of specific sets of vibrational bands associated to a molecule, such as in a barcode method previously employed to analyze data with SERS optophysiology¹⁷⁻¹⁸ (a detailed discussion is provided in the supporting information). ANN was used here to triage SERS spectra of different metabolites to address limitations of these methods. Herein, we extracted and associated multiple barcodes corresponding to the same molecule arising from different orientations and hotspots sampled by the molecule on a SERS nanosensor (see methods section for details, and Fig. S4.1 for SEM images of the nanosensor showing some level of aggregation of the nanoraspberries for high SERS response). Specifically, we used a 1-D convolutional neural network (CNN), a deep neural network architecture originally suited for 2-D image recognition.²⁹⁻³⁰ Similar to object recognition, where the neural network must be trained with multiple images of the object in different perspective to achieve high selectivity, we trained the neural network with a series of SERS spectra for each metabolite, accounting for the different SERS responses associated with the molecule. The model was composed of 2 convolutional layers, 2 pooling layers and 2 densely connected neuron layers (available on GitHub <https://github.com/SPRBiosensors/Convolutional-Neural-Network-SERS-optophysiology>). The final output was then transferred to a normalized exponential function (softmax function), which converted the output into a probabilistic value. The metabolite with the highest probability was attributed a value of 1 (positive assignment), while the others were all attributed a value of 0 (negative assignment).

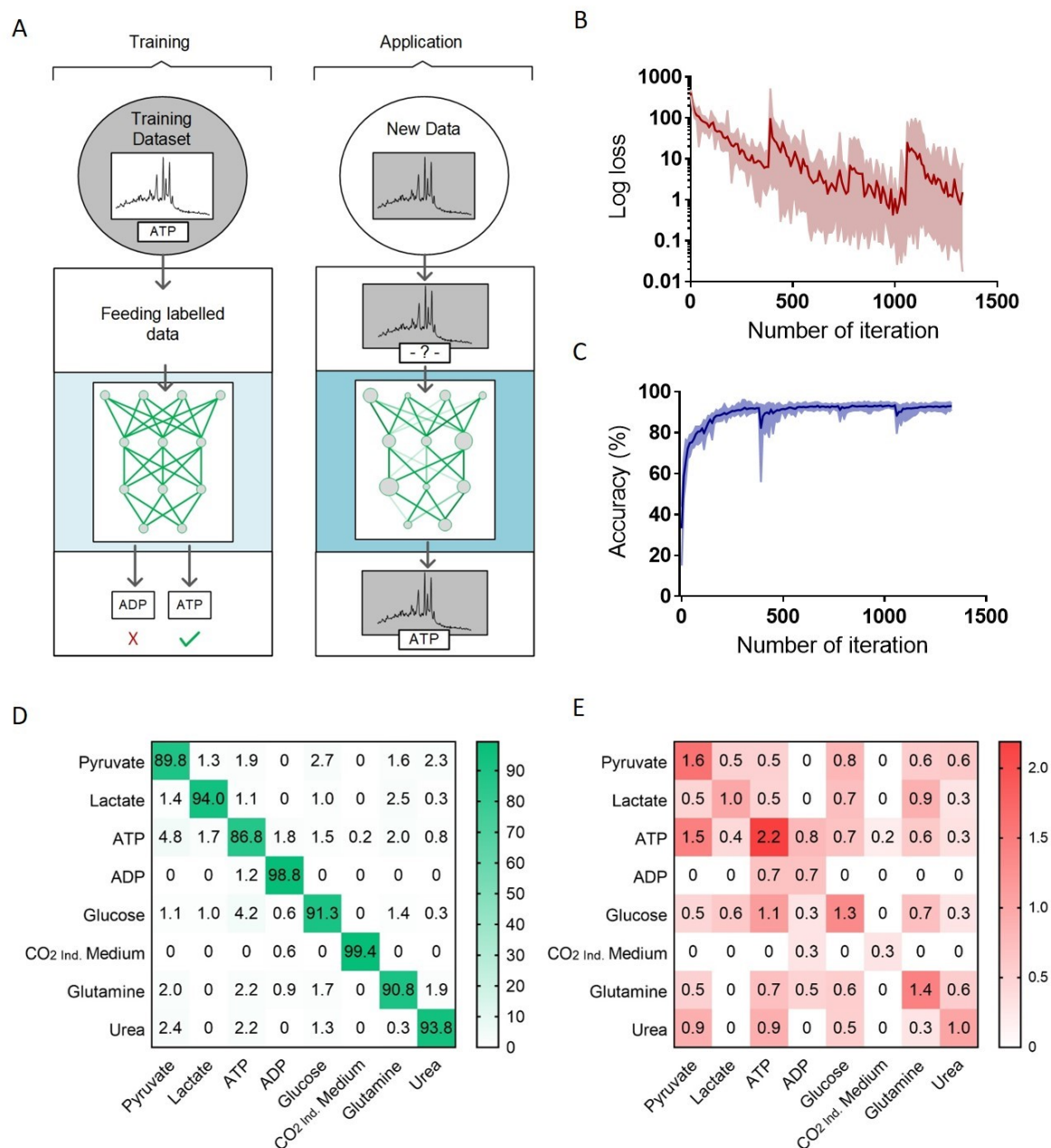


Figure 4.1 (A) General scheme of a convolutional neural network (CNN). Pre-processed training dataset were fed into the untrained neural network (left). Each data was labelled to their corresponding metabolites. Weights, represented as grey spheres, were then optimized (schematized as variable sizes) in order to minimize the error of the output of the neural network. Following the optimization of the model for those specific metabolites, unknown data, acquired and pre-processed in the exact same way, were fed into the trained model (right). The output

results, define as a prediction, returned a value of 1 for the corresponding metabolites having the highest classification probability. SERS spectra were all sorted, and counted based on this classification process. (B) Cross-entropy loss and (C) accuracy throughout training of the CNN. Mean and range are presented of 10 randomized training and test datasets. Each training was performed on a training dataset composed of at least 1000 spectra per metabolite. The cross-entropy loss corresponded to the mean square error between the prediction, and the true expected value. (D) 10 k-fold confusion matrix, in percentage (%), of randomized validation dataset using a trained CNN for vibrational recognition of pyruvate, lactate, ATP, ADP, glucose, glutamine and urea. The cellular medium (CO₂ independent medium) was included in order to categorize positive event associated to the medium. The normalized mean number of spectra is presented. The mean value was evaluated by training the CNN ten times while shuffling the SERS spectra used for both training, and validation between training (10-k fold). The associated s.e.m. is respectively presented in (E). The validation dataset included an average number of 80 spectra per metabolite.

At least 7 different metabolites were simultaneously monitored with SERS optophysiology. Briefly, 1,000 SERS spectra were acquired from pure aqueous solutions containing either pyruvate, lactate, ATP, ADP, glucose, glutamine, urea or the CO₂ independent cell culture medium (background). Data were labeled, pre-processed, randomly separated into training (60%), test (20%) and validation sets (20%), and fed into the CNN (Fig. 4.1A). The mean square error, referred to as cross-entropy, between the predicted and the expected assignation was calculated using the test set during the learning process. To minimize the cross-entropy and classification error, the weights and biases were optimized by gradient descent through backpropagation. Once the cross-entropy reached a minimum on the test set (Fig. 4.1B and C), the training was stopped.

Training and testing were repeated ten times to evaluate both the reproducibility and reliability of the model since weights and bias were initialized with random values. The final network was then validated with a 10-k fold cross-validation. The mean normalized number of spectra correctly sorted in the validation set is presented as a confusion matrix (Fig. 4.1D) and its corresponding standard deviation (Fig. 4.1E). The confusion matrix showed excellent sorting capability for the different metabolites with an accuracy of over 86.8 % and very few false

positives ($< 4.8\%$; Fig. 4.1D), a significant improvement compared to the previous method where accuracy was between 50% and 70%, with false positive rates were as high as 20%.¹⁷

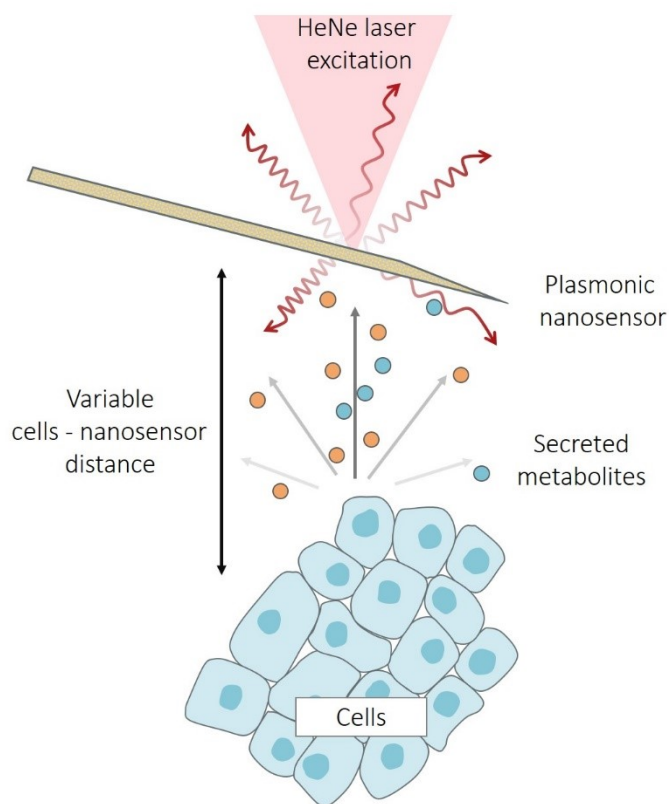


Figure 4.2 Representation of the SERS optophysiology distance curves experiments. A plasmonic nanosensor, composed of a random array of gold nanoraspberries, was positioned above cells. A HeNe laser (632.8 nm) was focused on the top part of the nanosensor, kept at the exact same position throughout the experiment, and SERS spectra were acquired for a period of time. Metabolites diffusing from the cell to the nanosensor surface lead to enhanced Raman spectra, allowing the identification of the secreted metabolites. SERS spectra were acquired at different cell – nanosensor distances, which enabled the generation of distance curves. 500 SERS spectra were acquired per distance, with an integration time of 500 ms/spectrum (632.8 nm excitation wavelength, 63x/1 NA).

The model was then applied to classify SERS spectra acquired in SERS optophysiology measurements in the vicinity of living cells. The SERS nanosensors were positioned near cellular surface (Fig. 4.2) using a piezo positioning stage allowing sub-micron spatial resolution as described elsewhere.¹⁸ Cells were kept at 37 °C in CO₂ independent medium, thus providing

essential nutrients while keeping the cells in basal condition. SERS spectra were acquired at different distances from the cell surface, ranging from 2 mm to an estimated distance shorter than 1 μm (Fig. 4.3). These measurements were analogous to force distance curves in atomic force microscopy or approach curves in scanning electrochemical microscopy.³¹ We performed such distance curves on three cell types: primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), the human cancer cell line HeLa and the immortalized rat embryonic fibroblasts cell line REF52, where the REF52 are non-secreting cells and could be viewed as a negative control in the experiments.

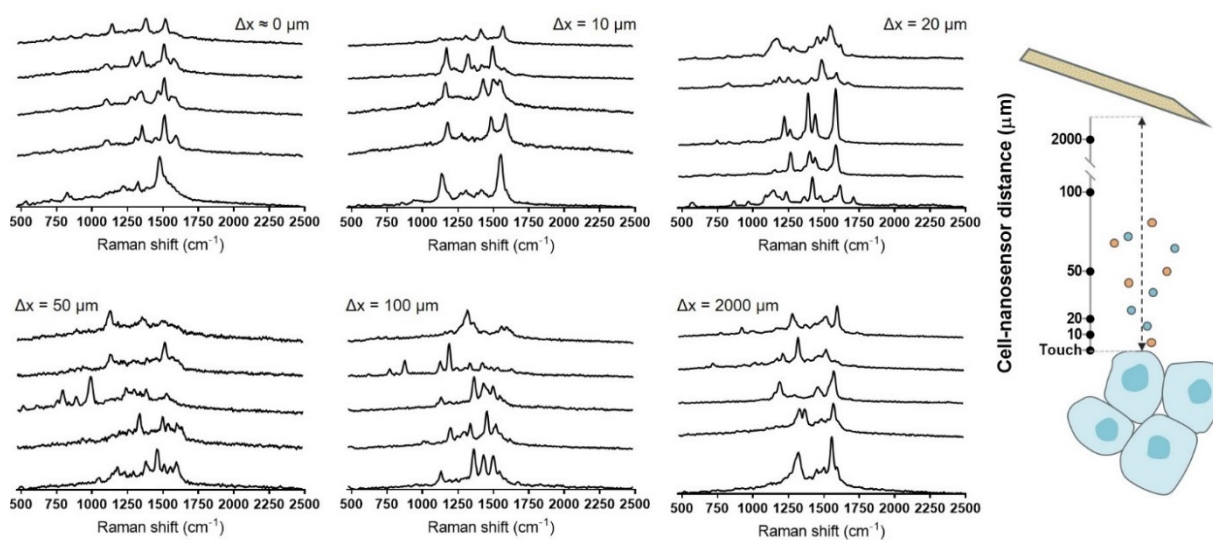


Figure 4.3 Typical SERS spectra acquired in time at different cell-nanosensor distances for HeLa cells. Five randomly selected positive SERS spectra are presented for each distance (left), and representation of the step-wise approach near cells to monitor secreted metabolites (right). The presented SERS spectra were all preprocessed, which included a Savitzky-Golay (SG) noise filter and barcoded in order to retain only SERS spectra with at least two significant Raman bands. The SERS spectra were then sequentially presented to the convolutional neural network (CNN) for classification within the various classes of metabolites, in which the network was trained for beforehand.

From the SERS optophysiology experiments with these cell lines, we are anticipating an increase or a decrease in the absolute number of metabolite detection events based on either up- or down-regulation of specific metabolic pathways involved in living cells (Fig. 4.4). Typically, cancer cells are expected to increase their consumption of glucose and glutamine and also increase the secretion of lactate compared to healthy cells due to a faster glycolysis rate of cancer cells. This increase in glycolysis flux also support an improved ATP production through the tricarboxylic acid cycle (TCA) which, can ultimately lead to increased ATP secreted extracellularly. Thus, by sensing different cell lines, including non-cancerous (HUVEC and Ref52) and cancerous (HeLa), measurable changes in their extracellular metabolites profiles was expected to be observed with SERS optophysiology and correlate to their respective phenotype.

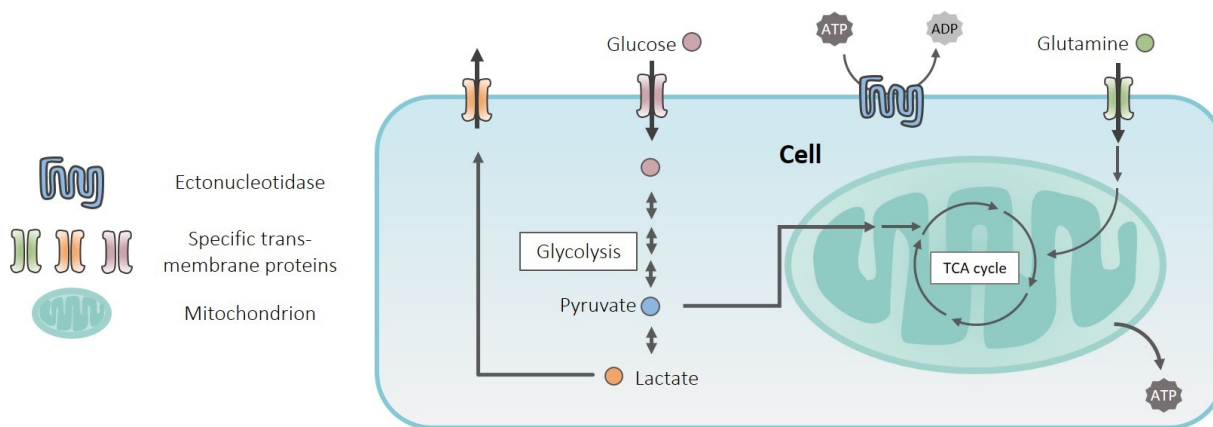


Figure 4.4 Simplified representation of metabolic pathways involved in typical living cells such as glycolysis and the tricarboxylic acid cycle (TCA) allowing the biosynthesis of the energy-associated metabolite ATP. The metabolites related to these pathways were measured with SERS optophysiology (see Fig. 4.5). Cells consume glucose from the extracellular environment. Glucose then go through glycolysis, where ultimately, glucose is converted into pyruvate and lactate by various enzymes. As a primary waste, lactate is excreted by cells. Furthermore, pyruvate is then used in the tricarboxylic acid cycle (TCA) enabling the significant production of ATP by the mitochondria. As a primary source of nitrogen for nucleotide biosynthesis, glutamine is consumed by living cells from the extracellular environment, in order to support the ATP production throughout the TCA cycle. ATP can be excreted by cells using specific membrane protein such as the ATP Binding Cassette (ABC). ATP located in the close

vicinity of the cells is then reduced to ADP, AMP and ultimately adenosine nucleotide. These metabolic pathways are expected to be present for all living cells. However, different phenotypes lead to the up- or down-regulation of some of these pathways. These phenotypes are thus associated to a change in: (1) the consumption of glucose and/or glutamine, and (2) the secretion of lactate, ATP and urea, where urea is the main waste of nitrogen, and finally (3) an increase concentration of ADP localized near cells.

While approaching the SERS nanosensor to the cellular surface, extracellular ATP, ADP, lactate and urea all showed an increase, or a tendency of increase, in detection rates within 20 μm of HUVEC and HeLa cells (Fig. 4.5B, D and F). We also observed a concomitant decrease in glucose and glutamine detection rates. The different gradients measured with SERS optophysiology agree with the expected uptake or release of metabolites (Fig. 4.4). For all metabolites, no significant differences were observed for REF52 cells while approaching the cellular surface, expected as these cells are non-secretory. In the case of pyruvate, no changes in detection rates were recorded while approaching for all cell lines, due to its presence in the culture medium at high concentration (Fig. S4.2). These results emphasized on the capability of SERS optophysiology to locally monitor metabolites flux near living cells (distance of 0 μm) compared to the bulk (distance of 2000 μm) for different metabolites (Fig. S4.3). Significant increases in extracellular ATP, lactate and urea count for HUVEC and HeLa were observed compared to REF52 (Fig. 4.5A, C and E). A greater number of ATP counts was also observed for HUVEC compared to HeLa (Fig. 4.5A), while a not significant (ns) difference was obtained for lactate. No significant changes were measured for both ADP and urea near all cell types (Fig. S4.3 and S4.4).

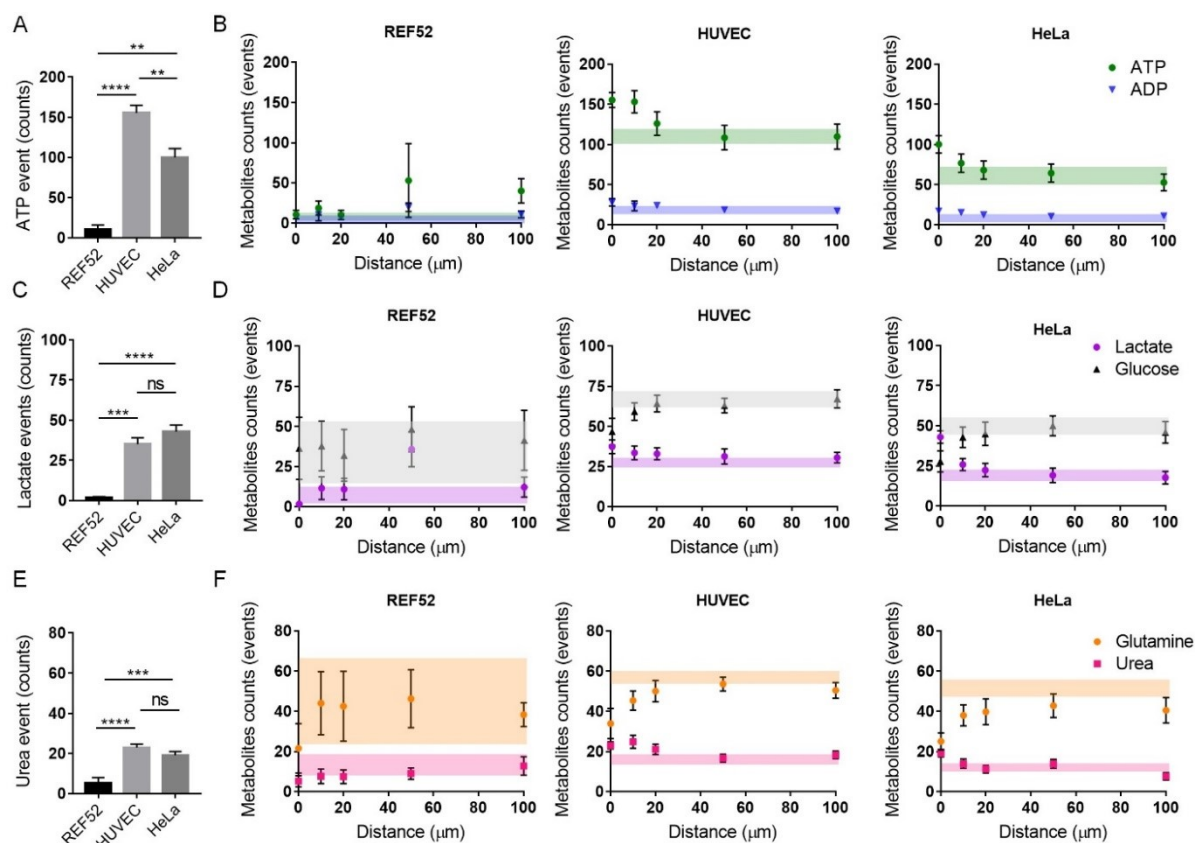


Figure 4.5 Multiplex metabolites sensing near living cells. Extracellular ATP (A), lactate (C) and urea (E) events while nearly touching (distance approaching 0 μm) the cellular membrane surface of fibroblast (REF52), Endothelial (HUVEC) and cancerous (HeLa) cell line in CO_2 independent medium. Extracellular ATP, lactate and urea counts were compared between cell lines using one-way ordinary ANOVA. **P<0.01; ***P<0.001; ****P < 0.0001; ns: not significant. Distance curves of extracellular ATP and ADP (B), lactate and glucose (D), and urea and glutamine (F) near REF52 (left), HUVEC (centre) and HeLa (right). The color bands correspond to the mean \pm s.e.m. number of events of the corresponding metabolite at a distance of 2000 μm away from the living cells. Mean \pm s.e.m. are presented. ($N_{\text{exp}} = 2$; $n = 5$ for REF52, $N_{\text{exp}} = 4$; $n = 16$ for HUVEC and $N_{\text{exp}} = 5$; $n = 20$). N is the number of independent cell preparations, while n is the number of replicates within one set of experiments.

The multiplexed analysis afforded by SERS optophysiology reveals complex metabolite profiles. Secreted metabolites were investigated in basal culture conditions for all types of cells. Without specific stimulation, we were not expecting to promote important metabolic changes

regarding the consumption of ATP by the cells, which rationalize the relatively constant ATP:ADP ratio at every distance (Fig. S4.5, Top). The relatively high ratio at a distance far from the cells is associated with a lower concentration of ADP in the extracellular environment (Fig. 4.5B). Once secreted by cells, ATP is degraded into ADP and AMP by enzymes belonging to the family of ectonucleotidase.³²⁻³³ Consequently, fewer events were expected far from the cells for both purines, leading to a constant ATP:ADP ratio. HUVEC cells exhibited a greater ATP:ADP ratio compared to HeLa and REF52 at all cell-nanosensor distances. HUVEC cells have been putatively reported to secrete ATP from the ATP-Binding cassette (ABC) protein with applied shear stress and in basal condition.³⁴⁻³⁵ The high abundance of ABC membrane protein led to a greater likelihood to secrete ATP in the extracellular environment, inferring the greater extracellular secretion of ATP of HUVEC cells compared to the others. HeLa cells also exhibited a greater ATP detection rate compared to the non-secreting REF52 cells, since cancer cell have an important level of extracellular ATP in their peripheral environment compared to non-cancerous cells.³⁶

Among physiological processes, glycolysis is the highest flux of carbon in cells. Hence, the SERS optophysiology experiments showed a lower detection rate for glucose near cells (Fig. 4.5). Within cancer cells, the high glycolysis rate allows a faster production of ATP than the oxidative phosphorylation (OXPHOS) from mitochondria, although much less efficiently.³⁷⁻³⁸ Enzymes involved in glycolysis have shown to be overexpressed within a range of 2-500 fold increase in different tumors³⁹, especially, to support important cellular division and metabolism. The glycolytic flux can be evaluated by measuring the glucose uptake and lactate production of the cells.⁴⁰ An important glucose consumption will lead to an increase in secretion of lactate in the extracellular medium. Hence, a greater extracellular lactate detection rate and lactate:glucose ratio (Fig. S4.5, Bottom) were observed for cancer HeLa cells compared to non-cancerous HUVEC and REF52 cells, as expected from the more important glycolytic flux.⁴¹ An increase was also noted for HUVEC compared to REF52. The simultaneous increase in lactate and decrease in glucose events while approaching the HeLa cells associated to a greater consumption of extracellular glucose (Fig. 4.5D) are rationalized by the Warburg's effect, which describe the capacity of cancer cells to exploit glycolysis more effectively even in presence of oxygen by bypassing the mitochondrial chain respiration.⁴¹

Analogous to the carbon cargo represented with glucose and lactate, glutamine correspond to one of the major nitrogen precursors for living cells. The SERS optophysiology results showed a significant consumption of glutamine by the different cell types, represented by a decrease in the number of events closer to cells (Fig. 4.5E). Similar to glucose, cancerous cells will exhibit an important extracellular consumption of glutamine in order to support nitrogen requirement resulting from the cell proliferation and nucleotide biosynthesis.⁴² Normally, glutamine can ultimately lead to the production of ammonium (NH_4^+) by sequential conversion from glutaminase (GLS or GLS2)⁴³ and glutamate dehydrogenase within the mitochondria.⁴⁴ In living organism, the excess of ammonium resulting from glutamine consumption is excreted by cells, transit through the bloodstream to the liver, where the urea cycle (also known as Krebs cycle) take place within the hepatocytes.⁴² Interestingly, we do see a tendency of increase for urea near cancer cells (Fig. 4.5E and Fig. S4.3). While this result remains unexplained, it shows that SERS optophysiology can serve to explore complex metabolic pathway that may be activated in cells.

It is noteworthy to mention that SERS optophysiology remains a semi-quantitative method at this time. One aspect implies the inherent variability of the nanosensor resulting from the self-assembly of nanoparticles. Recently, we developed a polymer-template approach to prepare highly reproducible SERS nanosensor with improved sensitivity.⁴⁵ By employing such protocol, the nanosensor variability will be minimized, and facilitate the acquisition of quantitative data. Also, validating the SERS optophysiological response with other methods, such as MS or CE will be highly interesting. Validation of the method is beyond the scope of the current paper as there is limitations in microsampling at different distances from the cells, but remains an essential aspect for further improvement of the technology. Nonetheless, results presented herein agree with expected biological behaviors from the various cell lines, which strengthen the validity of the SERS optophysiological response.

4.4. Conclusions

Herein, we report the combination of machine learning and SERS optophysiology as a non-destructive and label-free method using a nanosensor to observe, in a single experiment,

the gradients of multiple metabolites in the extracellular environment of a series of cells. Specifically, SERS optophysiology provided intricate details about the uptake and secretion of different metabolites of secretory (HeLa and HUVEC) cells. While we reveal metabolite gradients for a series of characterized cells and a panel of metabolites, the technique is generally applicable in cell biology to different metabolites and cell models. We anticipate that more in depth and complex analysis of the metabolite secretome will have important implication in the study of various cancers and for other pathologies. We also predict that with the rapid growth of deep learning algorithm, SERS optophysiology in combination with artificial intelligence has the capabilities to significantly further our understanding of fundamental cell biology. We envision that the technique could be applicable for a series of important challenges, such as to monitor the impact of drug treatments on cells, viruses and bacteria, and may also be applicable for *in vivo* experiments.

4.5. Author contributions

F.L., D.M., J.P.S., and J.-F.M. designed the experiments. F.L. carried out the fabrication of the nanosensors, performed the SERS measurements, and developed the machine learning algorithm. D.M. carried out the cell culture. All authors discussed the experimental results and participated in writing the manuscript.

4.6. Acknowledgements

We would like to thanks Johannes Bütow for the introduction to machine learning and fruitful discussion, and Klaus Weishaupt for providing the inertial drive and support throughout the project. This work was funded by the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQ-NT; team grant 181843 to J.-F.M. and Audace grant 2019-AUDC-262722), the Canadian Foundation for Innovation (CFI; grant 12910 to J.-F.M.), the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC; grant RGPIN-2016-03864 to J.-F.M.), and the Max Planck Society (J.P.S., D.M.).

4.7. Materials and Methods

4.7.1. Nanoparticles synthesis:

Before the gold nanoraspberries synthesis, glassware were thoroughly cleaned with *aqua regia* (3:1 HNO_3 : HCl). **Caution**, *aqua regia* is highly corrosive! Nanoraspberries were prepared by adding 3 mL of 100 mM HEPES (Carl Roth GmbH, Germany) at pH 7.4 to 100 mL of 18-M Ω water and stirred vigorously. 100 μL of 250 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, USA) was added dropwise while stirring vigorously. The solution was protected from light and stirred overnight. Nanoraspberries were centrifuged at 5000 rpm at 10 °C for 50 minutes. Supernatant was discarded, and nanoraspberries were washed three times with water. Following the final washing step, fractions were combined, and diluted to a final volume of 10 mL in 18-M Ω water.

4.7.2. SERS nanosensor fabrication:

Borosilicate glass capillaries (1 mm outer diameter, 0.5 inner diameter, 10 cm length) were pulled and cleaned as described elsewhere.¹⁸ Briefly, glass capillaries were pulled using the following parameters: stage (1): heat: 280, filament: 3, velocity: 15, delay: 145, pull: 20; stage (2) heat: 425, filament: 0, velocity: 15, delay: 128, pull: 200. The resulting nanopipettes were nearly 500 nm diameter and 13° cone angle at the tip¹⁶. Nanopipettes were then immersed upside down in a 3:1 H_2SO_4 : H_2O_2 piranha solution (**caution**, piranha solution is extremely corrosive, and reacts violently with organic compounds!) for 90 minutes, rinsed thoroughly with 18-M Ω water, and finally rinsed once with acetone, and kept in the oven at 90°C until used. Cleaned nanopipettes were immersed upside down, with constant stirring for 30 minutes, in a fresh solution of 0.3 % v/v APTES in acetone. APTES-coated nanopipettes were then rinsed three times with acetone, sonicated in acetone for 30 seconds, and dried in an oven for, at least, 12 hours at 90°C. APTES-coated nanopipettes were kept at 90°C until use. The APTES-coated nanopipettes were then exposed to a diluted colloidal solution, composed of 500 μL concentrated nanoraspberries in 20 mL 18-M Ω water, for one hour, without stirring. The 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) resulting nanoraspberries coated nanopipettes were rinsed

with 18-M Ω water, and kept in a dry place, protected from light. At this point, the functionalized capillaries were referred to as SERS nanosensors.

4.7.3. Cell growth procedure:

Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), pooled from different donors, were purchased from Promocell (Cat # C-12203) and cultured according to the instructions provided as sub-confluent monolayers at 37°C and 5% CO₂ in supplemented endothelial cell growth medium (Promocell; Cat # C-22010). HUVEC were used until passage 8. The rat fibroblast cell line REF52 and the cancer cell line HeLa were cultured as sub-confluent monolayers at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Life Technologies; Prod. # 10938), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). For SERS optophysiology experiments, cells were seeded on FN-coated glass-bottom dishes (WillCo Wells, UK). Prior to measurements, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and medium was exchanged to CO₂ independent medium (Thermo Scientific; Cat # 18045).

4.7.4. SERS optophysiology:

Raman measurements were performed on an Alpha300 Raman microscope from WITec (Ulm, Germany) using a 632.8 nm HeNe laser as excitation wavelength. SERS nanosensors were mounted on a custom machined magnetic holder and fixed on an external inertial driver. The inertial drive was mounted above the microscope objective as described elsewhere¹⁸. The inertial drive, similar to the one used to mount AFM cantilever, allowed to position the SERS nanosensor underneath the microscope objective, and kept the nanosensor in the focal point throughout the experiment. The probed area was thus always the same for a specific nanosensors. The distance between the SERS nanosensor and the cell tissue was controlled with sub-micron resolution by using the Raman microscope. The cells were positioned by using an x-y scan table. Cells were kept at 37°C by using a removable heating stage. SERS optophysiology experiments were performed in CO₂ independent medium using a 63X Plan-Apochromat immersion objective (NA = 1) from Zeiss (Oberkochen, Germany). Prior to the experiments, the medium was changed to ensure a minimum interference from the secreted

metabolites into the extracellular environment. SERS nanosensors were positioned at specific distance above the cells, and Raman spectra were acquired (laser power of 1 mW, integration time of 500 ms per spectrum). 500 Raman spectra were acquired at each position. The experiment was repeated above different cells with a different SERS nanosensor.

4.7.5. Data processing using convolutional neural network:

SERS spectra were analyzed with a custom algorithm on MatLab (Mathworks, MA). Briefly, adaptative iteratively reweighted penalized least squares (airPLS) was applied on each SERS spectrum to evaluate the baseline ($\lambda = 1e+08$; order = 2; p value = 0.05)⁴⁶. The extracted baseline was added to a scalar value (e.g. 0.02 times the median value of the spectrum), leading to the generation of a curved threshold line, an alternative to background subtraction which may introduce unintended artefacts⁴⁷. Then, a Savitzky-Golay (SG) noise filter was applied on each SERS spectra to enhanced the spectral quality (polynomial order = 3, frame = 7). Barcodes were extracted from every SERS spectrum using the built-in function *findpeaks* in MatLab. The intensities of the detected Raman peaks were then compared to curved threshold line for the respective frequencies. Only peaks exhibiting a higher, or equal intensity to the curved threshold line were used to generate the experimental barcode. At the end, experimental barcodes from SERS spectra exhibiting peaks significantly greater than the background were extracted. Barcodes with, at least, 2 bars were used for training the convolutional neural network. We analytically obtained a greater accuracy by feeding the whole SERS spectrum, rather than the associated barcodes.

The SERS spectra were analyzed with TensorFlow⁴⁸ for classification by a convolutional neural network (CNN). SERS spectra were scaled from 0 to 1, labelled, shuffled and separated into training, test and validation sets. The CNN model corresponds to (1) a convolutional layer applying a 2x1 weight filter, (2) a 2 x 1 max pooling layer, (3) convolutional layer applying a second 2x1 weight filter, (4) a 2 x 1 max pooling layer, (4) a densely connected layer and finally, (5) a second densely connected layer and a finally, (6) softmax which converted the output of the previous connected layer into a probabilistic output. The training set was fed into the model by batches of 100 spectra, enabling stochastic gradient descend. To minimize overfitting, dropout was applied to the model. During the training stage, 50 percent of the neurons of the

model were randomly selected, and dropped. The dropout process ensured that the neural network was not over relying on any particular neuron for classification, thus decreasing the overfitting probabilities.

4.8. References

1. Segota, I.; Franck, C., Extracellular Processing of Molecular Gradients by Eukaryotic Cells Can Improve Gradient Detection Accuracy. *Phys. Rev. Lett.* **2017**, *119* (24), art. 248101.
2. Swaney, K. F.; Huang, C.-H.; Devreotes, P. N., Eukaryotic Chemotaxis: A Network of Signaling Pathways Controls Motility, Directional Sensing, and Polarity. *Ann. Rev. Biophys.* **2010**, *39* (1), 265-289.
3. Roussos, E. T.; Condeelis, J. S.; Patsialou, A., Chemotaxis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 573-587.
4. Gregor, T.; Wieschaus, E. F.; McGregor, A. P.; Bialek, W.; Tank, D. W., Stability and Nuclear Dynamics of the Bicoid Morphogen Gradient. *Cell* **2007**, *130* (1), 141-152.
5. Gregor, T.; Tank, D. W.; Wieschaus, E. F.; Bialek, W., Probing the Limits to Positional Information. *Cell* **2007**, *130* (1), 153-164.
6. Condeelis, J.; Singer, R. H.; Segall, J. E., THE GREAT ESCAPE: When Cancer Cells Hijack the Genes for Chemotaxis and Motility. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21* (1), 695-718.
7. Roussos, E. T.; Condeelis, J. S.; Patsialou, A., Chemotaxis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 573.
8. Huang, W. H.; Ai, F.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K., Recent advances in single-cell analysis using capillary electrophoresis and microfluidic devices. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *866* (1-2), 104-122.
9. Comi, T. J.; Do, T. D.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V., Categorizing Cells on the Basis of their Chemical Profiles: Progress in Single-Cell Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (11), 3920-3929.
10. Römpp, A.; Spengler, B., Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem. Cell Biol.* **2013**, *139* (6), 759-783.

11. Imamura, H.; Huynh Nhat, K. P.; Togawa, H.; Saito, K.; Iino, R.; Kato-Yamada, Y.; Nagai, T.; Noji, H., Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.* **2009**, *106* (37), 15651-15656.
12. Tantama, M.; Martínez-François, J. R.; Mongeon, R.; Yellen, G., Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2550-2550.
13. Morciano, G.; Sarti, A. C.; Marchi, S.; Missiroli, S.; Falzoni, S.; Raffaghello, L.; Pistoia, V.; Giorgi, C.; Di Virgilio, F.; Pinton, P., Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1542-1562.
14. Kneipp, J.; Kneipp, H.; Kneipp, K., SERS - a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 1052-1060.
15. Vitol, E. A.; Orynbayeva, Z.; Bouchard, M. J.; Azizkhan-Clifford, J.; Friedman, G.; Gogotsi, Y., In Situ Intracellular Spectroscopy with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)-Enabled Nanopipettes. *ACS Nano* **2009**, *3* (11), 3529-3536.
16. Masson, J.-F.; Breault-Turcot, J.; Faid, R.; Poirier-Richard, H.-P.; Yockell-Lelièvre, H.; Lussier, F.; Spatz, J. P., Plasmonic Nanopipette Biosensor. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (18), 8998-9005.
17. Lussier, F.; Brulé, T.; Vishwakarma, M.; Das, T.; Spatz, J. P.; Masson, J.-F., Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events. *Nano Lett.* **2016**, *16* (6), 3866-3871.
18. Lussier, F.; Brulé, T.; Bourque, M.-J.; Ducrot, C.; Trudeau, L.-É.; Masson, J.-F., Dynamic SERS nanosensor for neurotransmitter sensing near neurons. *Faraday Discuss* **2017**, *205* (0), 387-407.
19. Goodacre, R., Explanatory analysis of spectroscopic data using machine learning of simple, interpretable rules. *Vib Spectrosc* **2003**, *32* (1), 33-45.
20. Liu, J.; Osadchy, M.; Ashton, L.; Foster, M.; Solomon, C. J.; Gibson, S. J., Deep convolutional neural networks for Raman spectrum recognition: a unified solution. *Analyst* **2017**, *142* (21), 4067-4074.

21. Finger, T. E.; Danilova, V.; Barrows, J.; Bartel, D. L.; Vigers, A. J.; Stone, L.; Hellekant, G.; Kinnamon, S. C., ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves. *Science* **2005**, *310* (5753), 1495-1499.
22. Burnstock, G., Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol. Rev.* **2007**, *87* (2), 659-797.
23. Davalos, D.; Grutzendler, J.; Yang, G.; Kim, J. V.; Zuo, Y.; Jung, S.; Littman, D. R.; Dustin, M. L.; Gan, W.-B., ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 752-758.
24. Di Virgilio, F.; Adinolfi, E., Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* **2016**, *36*, 293-303.
25. Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B., Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324* (5930), 1029-1033.
26. Gatenby, R. A.; Gillies, R. J., Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 891-899.
27. Cairns, R. A.; Harris, I. S.; Mak, T. W., Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 85-95.
28. Altman, B. J.; Stine, Z. E.; Dang, C. V., From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 619-634.
29. Krizhevsky, A.; Sutskever, I.; Hinton, G. E., ImageNet classification with deep convolutional neural networks. In *Proceedings of the 25th International Conference on Neural Information Processing Systems - Volume I*, Curran Associates Inc.: Lake Tahoe, Nevada, 2012; pp 1097-1105.
30. Farabet, C.; Couprie, C.; Najman, L.; LeCun, Y., Learning Hierarchical Features for Scene Labeling. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **2013**, *35* (8), 1915-1929.
31. Amemiya, S.; Bard, A. J.; Fan, F.-R. F.; Mirkin, M. V.; Unwin, P. R., Scanning Electrochemical Microscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)* **2008**, *1* (1), 95-131.
32. Cekic, C.; Linden, J., Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 177-192.
33. Deli, T.; Csernoch, L., Extracellular ATP and Cancer—An Overview with Special Reference to P2 Purinergic Receptors. *Pathol. Oncol. Res.* **2008**, *14* (3), 219-231.

34. Bodin, P.; Burnstock, G., Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2001**, *38* (6), 900-908.
35. Lohman, A. W.; Billaud, M.; Isakson, B. E., Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *95* (3), 269-280.
36. Pellegatti, P.; Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Piccardi, F.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F., Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLoS One* **2008**, *3* (7), e2599.
37. Cairns, R. A.; Harris, I. S.; Mak, T. W., Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 85.
38. Pfeiffer, T.; Schuster, S.; Bonhoeffer, S., Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **2001**, *292* (5516), 504-507.
39. Rafael, M. S.; Sara, R. E.; Alvaro, M. H.; Emma, S., Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **2007**, *274* (6), 1393-1418.
40. TeSlaa, T.; Teitell, M. A., Chapter Five - Techniques to Monitor Glycolysis. In *Methods Enzymol.*, Galluzzi, L.; Kroemer, G., Eds. Academic Press: 2014; Vol. 542, pp 91-114.
41. Draoui, N.; Feron, O., Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Dis Model Mech* **2011**, *4* (6), 727-732.
42. DeBerardinis, R. J.; Cheng, T., Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **2009**, *29*, 313-324.
43. Curthoys, N. P.; Watford, M., Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **1995**, *15* (1), 133-159.
44. Moreadith, R. W.; Lehninger, A. L., The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (10), 6215-21.
45. Zhu, H.; Lussier, F.; Ducrot, C.; Bourque, M. J.; Spatz, J. P.; Cui, W.; Yu, L.; Peng, W.; Trudeau, L. E.; Bazuin, C. G.; Masson, J. F., Block Copolymer Brush Layer-Templated Gold Nanoparticles on Nanofibers for Surface-Enhanced Raman Scattering Optophysiology. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11* (4), 4373-4384.
46. Zhang, Z.-M.; Chen, S.; Liang, Y.-Z., Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst* **2010**, *135* (5), 1138-1146.

47. Butler, H. J.; Ashton, L.; Bird, B.; Cinque, G.; Curtis, K.; Dorney, J.; Esmonde-White, K.; Fullwood, N. J.; Gardner, B.; Martin-Hirsch, P. L.; Walsh, M. J.; McAinsh, M. R.; Stone, N.; Martin, F. L., Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 664-687.
48. Abadi, M.; Agarwal, A.; Barham, P.; Brevdo, E.; Chen, Z.; Citro, C.; Corrado, G. S.; Davis, A.; Dean, J.; Devin, M.; Ghemawat, S.; Goodfellow, I.; Harp, A.; Irving, G.; Isard, M.; Jia, Y.; Jozefowicz, R.; Kaiser, L.; Kudlur, M.; Levenberg, J.; Mane, D.; Monga, R.; Moore, S.; Murray, D.; Olah, C.; Schuster, M.; Shlens, J.; Steiner, B.; Sutskever, I.; Talwar, K.; Tucker, P.; Vanhoucke, V.; Vasudevan, V.; Viegas, F.; Vinyals, O.; Warden, P.; Wattenberg, M.; Wicke, M.; Yu, Y.; Zheng, X. TensorFlow: Large-Scale Machine Learning on Heterogeneous Distributed Systems *arXiv e-prints* [Online], 2016. <https://ui.adsabs.harvard.edu/#abs/2016arXiv160304467A> (accessed March 01, 2016).

4.9. Supporting information

4.9.1. Current limitation of single barcode SERS optophysiology:

4.9.1.1. Discussion on the previous data processing algorithm:

The machine learning algorithm is compared to a previous method of analysing the SERS spectra. In order to temporally analyse complex and heterogeneous vibrational spectra, an algorithm was previously developed based on barcoding the SERS spectra for SERS optophysiology and applied to monitor small molecules liberated in the extracellular environment.¹⁻² Briefly, barcodes were extracted from acquired SERS spectrum, and compared to an external database of standard barcodes. When an experimental barcode had a sufficient number of bands (frequencies) matching the bands of the standard, the corresponding acquired spectrum generated a positive event for the corresponding standard. The process was repeated for all the acquired SERS spectra and ultimately, sorted and counted all SERS spectra.

A key feature of this approach was the usage of barcodes to simplify the optical response allowing a selective and sensitive classification. However, this is sub-optimal for SERS optophysiology. The performance of the sorting and counting processes, and thus, sensitivity and selectivity, highly depended on the quality of the standard barcodes used in our external database. SERS spectra are known to exhibit important spectral variation in band's frequencies, intensities, and in the presence of the band itself. Also, SERS spectra depend on the orientation of the molecule according to the local electrical field, and consequently, leading to further spectral variation for the same molecule in time.

Principal component analysis (PCA) was applied to extract the first principal component associated to the maximum variance. This component was used to generate a standard barcode whom consider these spectral variations. Although promising, the generation of standard barcodes including: the number of bands, the width of the band and the minimal distance between nearby bands was laborious, and required a novel optimization once a new molecule of interest was introduced into the standards database. These optimizations were highly time consuming, computationally intensive, and were not viable for future applications.

4.9.1.2. Advantage of SERS optophysiology

SERS optophysiology offers multiple advantages compared to conventional analytical tools. The label free sensing, originating from the intrinsic Raman scattering, allows a non destructive and minimally invasive sensing in biological environment without employing labels, such as in fluorescence microscopy, which may induce a biased biological response. Also, the SERS nanosensor developed herein allowed extracellular sensing/secreted metabolites, in which fluorescence is ill-suited. The spatiotemporal advantage is also significant compared to mass spectrometry (MS) and capillary electrophoresis (CE). MS and CE usually probed the extracted or perfused supernatant, compromising the analysis of specific cellular domain such as the tumor microenvironment. SERS optophysiology can tackle those limits, by enabling local sensing near cells, and allowing a temporal analysis of cellular environment throughout time upon external stimuli. While MS hold incomparable multiplex capabilities, by coupling SERS optophysiology to convolutional neural network, the complex optical response also enables a high multiplex capability. The approach developed herein is highly adaptable by training the network for the probed metabolites and hold promising application for fundamental biology research and medical diagnostics.

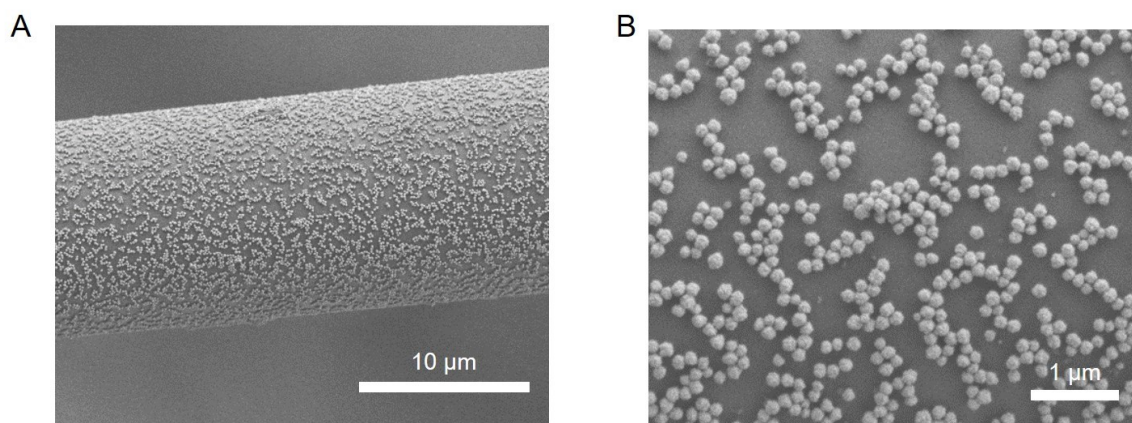


Figure S4.1 (A) SEM image of the gold nanoraspberry-coated nanosensor for SERS measurements near cells a magnification of 2,000X. (B) SEM image at higher magnification (10,000X) of the same nanosensor, showing that the nanoraspberry adsorbed in random array on the APTES modified glass nanopipette. All SEM images were acquired at an accelerating voltage of 1.5 kV.

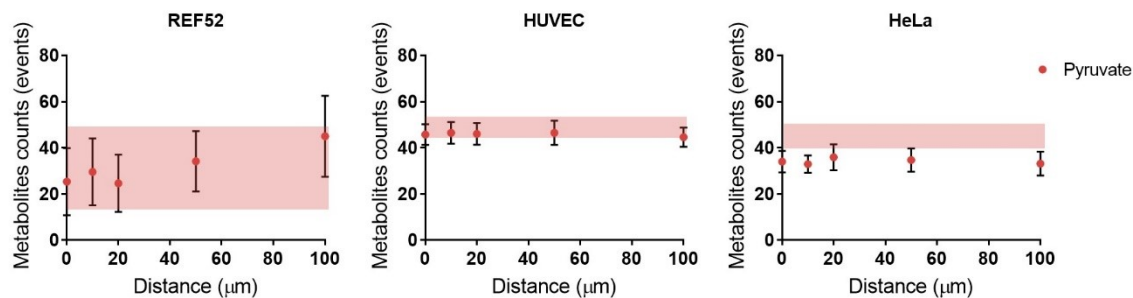


Figure S4.2 Distance curves of extracellular pyruvate near REF52 (left), HUVEC (center) and HeLa (right). The color bands correspond to the mean \pm s.e.m. number of events at a distance of 2000 μm away from the living cells. The plasmonic nanosensor was approached and positioned near the cells using an external inertial drive allowing sub-micro spatial resolution at different position. 500 SERS spectra were acquired per position, with an integration time of 500 ms/spectrum (632.8 nm excitation wavelength, 63x/1 NA). Mean \pm s.e.m. are presented. ($N_{\text{exp}} = 2$; $n = 5$ for REF52, $N_{\text{exp}} = 4$; $n = 16$ for HUVEC and $N_{\text{exp}} = 5$; $n = 20$).

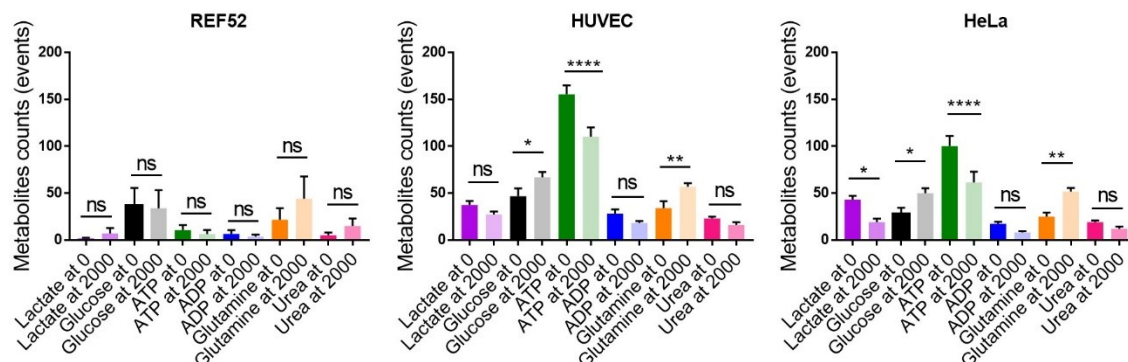


Figure S4.3 Metabolites counts near (distance of 0 μm) and far away (distance of 2000 μm) from the REF52, HUVEC and HeLa cells in CO_2 independent medium at 37 $^\circ\text{C}$. Extracellular lactate, glucose, ATP, ADP, urea and glutamine counts were evaluated by SERS optophysiology and classified by the convolutional neural network (CNN). The extracellular metabolites counts were compared between the two distances for each metabolites using one-way ordinary ANOVA. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$; ns: not significant. For urea, the P values are 0.5279; 0.4274 and 0.3545 for REF52, HUVEC and HeLa, respectively, while for ADP, the P values are 0.8464; 0.2510 and 0.2674 for REF52, HUVEC and HeLa, respectively. Mean and s.e.m. are presented. ($N_{\text{exp}} = 2$; $n = 5$ for REF52, $N_{\text{exp}} = 4$; $n = 16$ for HUVEC and $N_{\text{exp}} = 5$; $n = 20$).

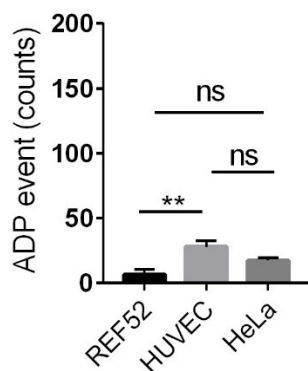


Figure S4.4 Extracellular ADP counts near ($x = 0$) REF52, HUVEC and HeLa cells in CO_2 independent medium at 37 $^\circ\text{C}$. Extracellular ADP counts were compared between cell lines using one-way ordinary ANOVA. ** $P < 0.01$; ns: not significant

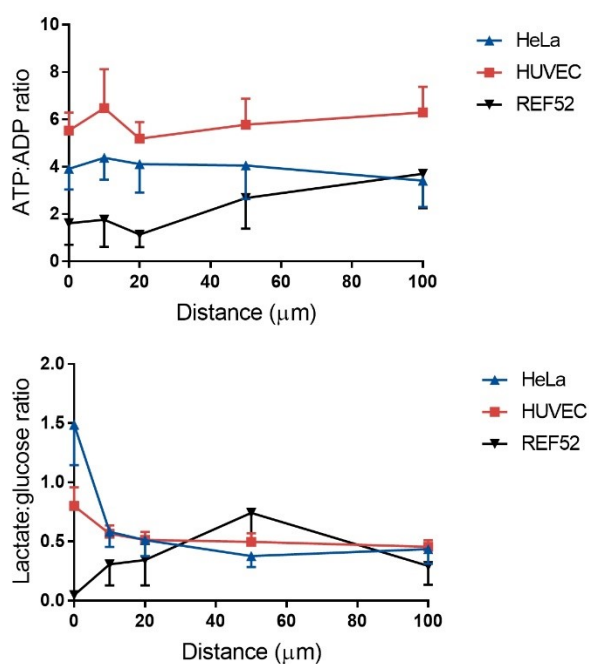


Figure S4.5 (Top) lactate: glucose ratio and (Bottom) ATP: ADP ratio at different cell to nanosensors distance near HeLa, HUVEC, and REF52 cells. Mean \pm s.e.m. are presented. ($N_{\text{exp}} = 2$; $n = 5$ for REF52, $N_{\text{exp}} = 4$; $n = 16$ for HUVEC and $N_{\text{exp}} = 5$; $n = 20$). N is the number of independent cell preparations, while n is the number of replicates within one set of experiments.

4.9.3 References:

1. Lussier, F.; Brulé, T.; Vishwakarma, M.; Das, T.; Spatz, J. P.; Masson, J.-F., Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events. *Nano Lett.* **2016**, *16* (6), 3866-3871.
2. Lussier, F.; Brulé, T.; Bourque, M.-J.; Ducrot, C.; Trudeau, L.-É.; Masson, J.-F., Dynamic SERS nanosensor for neurotransmitter sensing near neurons. *Faraday Discuss* **2017**, *205* (0), 387-407.

5. Conclusion

L'objectif de la thèse consistait au développement de nouvelles technologies dédiées à l'analyse des sécrétions cellulaires. Le capteur se devait de permettre ; une analyse localisée, afin de capturer les particularités de l'environnement extracellulaire en périphérie du capteur, être hautement sensible et permettre le multiplexage afin de suivre les changements rapides de plusieurs analytes simultanément, être non destructif et minimalement invasif afin de ne pas perturber la physiologie des cellules vivantes et finalement, offrir une bonne résolution spatio-temporelle. Ces spécifications analytiques sont nécessaires afin de pallier aux lacunes des méthodes actuelles en métabolomique. Pour y arriver, le projet de recherche fut séparé en trois sections principales, où chaque section rapporte les avancements de la méthode analytique développée, l'optophysiology, tout en parant les lacunes des itérations précédentes. Le chapitre de conclusion effectue un retour rapide sur ces sections et comment elles ont permis l'atteinte des objectifs de la thèse. Finalement, des perspectives basées sur les avancements présentés dans les différentes sections de la thèse seront suggérées afin d'axer les prochaines recherches sur des points clés.

5.1. Conclusions générales

5.1.1. L'optophysiology SERS

Suite au chapitre 2, présentant le développement de l'optophysiology et d'un nouveau capteur SERS composé de nanoparticules d'or adsorbées sur une *patch clamp* nanométrique, il en ressort que ces outils peuvent être employées pour l'analyse localisée de métabolites extracellulaires. D'abord, l'utilisation de nanoframboises d'or comme structure plasmonique permet d'accroître la sensibilité contrairement à l'utilisation de nanosphères d'or à cause de l'effet de pointes. Ces nanoparticules permettent la génération de capteur hautement sensible, critère essentiel permettant le suivi de molécules lors d'évènements de sécrétion cellulaire. De plus, l'emploi d'un code-barres pour distinguer et identifier un métabolite a permis l'analyse de quatre métabolites simultanément avant, et suite à la libération stimulée de métabolites cellulaires. En provoquant la formation de pores dans la membrane cellulaire, il fut possible

d'analyser certains métabolites contenus dans l'environnement intracellulaire tel le pyruvate. Cependant, l'utilisation d'un code-barres composé d'un nombre de bandes fixes (e.g. 10) implique que les molécules sondées doivent avoir un spectre SERS présentant environs 10 bandes. Dans un cas où le spectre SERS présente plus ou moins de 10 bandes, l'algorithme de traitement perd significativement sa sensibilité et sélectivité. Pour ces raisons, il ne fut pas possible de sonder le glucose extracellulaire dû à une faible sélectivité.

Néanmoins, la méthode analytique fut étudiée seulement dans un système où les métabolites sont libérés en utilisant un stimulus agressif provoquant la mort des cellules dans l'échantillon. La prochaine étape du projet, présentée au chapitre 3, consistait donc à évaluer si l'optophysiology et le capteur SERS actuel permettent le suivi de métabolites extracellulaires dans un système biologique où la sécrétion serait stimulée de manière cyclique et non destructive pour les cellules. Le système choisi fut des neurones dopaminergiques, où la libération de métabolites est facilement provoquée en changeant la composition du milieu extracellulaire. L'étude de neurones a aussi nécessité le développement d'un microscope bicanaux, permettant d'effectuer de l'imagerie de fluorescence et de la spectroscopie Raman en un même plan focal. Cet outil a permis de positionner de manière précise le capteur SERS près des zones ayant une grande densité de varicosités axonale, sites de libérations primaires de neurotransmetteurs. Cinq neurotransmetteurs ont été mesurés simultanément près des neurones et près d'astrocytes servant de cellules contrôles. Cependant, l'usage conjoint du capteur SERS et de l'algorithme de traitement chimiométrique n'ont pas permis la détection de glutamate, neurotransmetteurs importants colibérés par certains prolongements axonaux de neurones dopaminergiques. Une des hypothèses était que l'analyse chimiométrique demeurait trop restrictive, malgré l'utilisation d'un code-barres à bande variable.

L'idée fut d'associer plusieurs codes-barres pour une seule et même molécule afin d'augmenter le nombre d'événements conservé par l'algorithme. En conservant plus de spectres pour l'analyse, la sensibilité du traitement chimiométrique en serait augmentée. Le chapitre 4 présente une solution à ce problème : l'implémentation d'un réseau neuronal artificiel pour l'analyse de spectres SERS. Similaire aux réseaux employés en reconnaissance faciale, un CNN a été entraîné à l'aide de plusieurs milliers de spectres SERS. Ces spectres, correspondant à différents patrons vibrationnels découlant de la variation d'orientation de la molécule par

rapport à la surface, ont permis d'entraîner le réseau à la reconnaissance de sept métabolites cellulaires avec une haute sélectivité et une haute sensibilité. L'objectif suivant fut d'employer le CNN pour analyser les mesures d'optophysiology faite près de diverse lignée cellulaire. Cette expérience permettrait d'évaluer la capacité de l'optophysiology à mesurer des changements de compositions extracellulaires en fonction du phénotype (cancéreuse ou saine) des cellules. À l'aide de ces outils, il fut possible d'évaluer des gradients moléculaires près de trois lignées cellulaires différentes : HeLa, HUVEC et REF52. Le chapitre 4 correspond à une pierre angulaire dans le développement de l'optophysiology, en démontrant (1) le potentiel de cette technologie pour l'analyse localisée de l'environnement cellulaire, (2) l'adaptation rapide du traitement de données pour de nouvelles cibles moléculaires à l'aide de l'intelligence artificielle et finalement (3) la capacité d'effectuer un suivi de plus de 10 molécules simultanément en SERS sans marquage.

Pour finir, la thèse présente les premiers développements de l'optophysiology SERS. Les travaux présentés ont pavé la voie vers des études plus approfondies de systèmes biologiques complexes à l'aide de cette technologie. Bien que prometteur, l'optophysiology demeure à ces débuts et demande encore certaines améliorations afin de devenir une méthode analytique robuste et globalement acceptée par la communauté scientifique. Plusieurs perspectives sont donc évoquées dans la section suivante, axées sur des points clé qui nécessite davantage d'attentions afin de maximiser les développements futurs de l'optophysiology SERS.

5.2. Perspectives

5.2.1. Optophysiology SERS quantitative

5.2.1.1. Auto-assemblage préprogrammé

Actuellement, l'optophysiology SERS demeurent une méthode semi-quantitative. Afin de permettre l'acquisition de données quantitatives, plusieurs points doivent être corrigés. Comme rapporté dans les différents chapitres de la thèse, la variation importante de la sensibilité des capteurs, qui découle de l'autoassemblage des nanoparticules en surface, limite la reproductibilité et la fiabilité entre les mesures. La préparation de capteurs reproductibles est donc l'une des priorités. De plus, une plus haute sensibilité est nécessaire afin de permettre la

capture d'un plus grand nombre d'évènements moléculaires dans le temps. Une telle sensibilité permettrait la détection de chaque évènement associé à une seule molécule et l'acquisition de statistiques nécessaire afin de passer d'un mode de quantification basé sur l'intensité, à un basé sur le nombre d'évènements moléculaire¹. Ces deux points sont à eux seuls, les nerfs de la guerre pour l'atteinte de substrats SERS idéaux.

Récemment, Hu *et al.* ont rapporté l'utilisation de copolymère bloc (BCP) de polystyrène et de polyvinylpyridine (PS-b-P4VP) afin de permettre la génération de substrats SERS reproductible². L'obtention de réseaux ordonnés de nanosphères à l'aide du PS-b-P4VP sur des fibres nanométriques permet la création de capteurs SERS plus sensible que ceux générés par la méthode d'autoassemblage la plus commune utilisant de l'APTES. Bien que leurs propriétés optiques sont supérieures, il demeure difficile de comparer ces capteurs à ceux employés dans cette thèse. En effet, les nanoframboises d'or tel qu'utilisé dans la thèse génèrent un champ électrique localisé à l'apex des pointes environ 25 fois supérieur à ceux de nanosphères dû à l'effet de pointe³. La formation d'agrégats de nanoframboises aura pour conséquence d'accroître encore plus ce champ électrique local. Une comparaison directe entre ces capteurs SERS est donc requise.

L'utilisation de BCP pourrait être employée afin d'ordonner d'autres nanostructures telles des nanoframboises ou des nanoétoiles⁴⁻⁶. Ce faisant, les capteurs SERS offrirait une amplification substantielle de par l'effet de pointe, en plus de présenter une meilleure reproductibilité entre les capteurs. Cependant, la synthèse de nanoétoiles est peu reproductible. Cette option serait donc de déplacer le problème associé à l'autoassemblage peu reproductible, vers une synthèse peu reproductible. Pour pallier ce problème, l'utilisation de microfluidiques pour la synthèse de nanoparticules de formes asymétriques seraient une idée à explorer⁷⁻⁸, puisqu'elle permettraient de facilement augmenter le débit de production et réduire la polydispersité en offrant un meilleur contrôle sur le mélange des réactifs, séparer les étapes de nucléations et de croissance ainsi qu'un meilleur contrôle sur les conditions expérimentales⁹⁻¹⁰. Récemment, Abalde-Cela *et al.* ont démontré l'utilisation de gouttelettes générées par microfluidiques pour la synthèse contrôlée de nanoétoiles¹¹. En utilisant les gouttelettes comme microréacteurs, les auteurs ont démontré la génération d'étoiles à haut débit et de manière hautement reproductible. L'utilisation de microfluidiques pourrait donc résoudre les problèmes

de reproductibilités des nanoétoiles, et permettre l'assemblage de capteurs SERS plus sensibles composés de particules disposant de plusieurs pointes.

Une autre approche pourrait être d'effectuer une croissance asymétrique *in situ* de nanoparticules préalablement immobilisées en surface. En utilisant le BCP pour de créer le réseau hexagonal de nanosphères d'or, il serait possible d'utiliser ces nanoparticules comme noyaux et d'induire directement la croissance en surface de nanoétoiles. Cette approche fut entre autres appliquée à la synthèse de nanobâtonnets d'or (GNR) orientés sur une surface plane¹²⁻¹⁴. Le changement de morphologie des nanoparticules permettrait d'augmenter significativement la sensibilité des capteurs SERS, permettant la détection d'un plus grand nombre d'évènements moléculaires tandis que l'utilisation du BCP permet l'obtention de capteur plus reproductible, diminuant ainsi la variabilité entre les mesures.

5.2.1.2. SERS sans marquage quantitatif

Outre l'augmentation de sensibilité et de reproductibilité des capteurs SERS, il est possible de se pencher sur la méthode d'analyse spectrale afin de rendre la méthode quantitative. La quantification directe en SERS, c'est-à-dire sans utiliser de rapporteurs Raman, est possible en utilisant l'intensité de bandes Raman unique aux analytes d'intérêts. Parmi les méthodes chimiométriques disponibles, les approches les plus populaires sont basées sur la méthode des moindres carrées partielles (PLS)¹⁵. La PLS est une méthode de régression linéaire quantitative utilisant l'apprentissage par machine afin de faire des prédictions sur la concentration de l'analyte dans l'échantillon¹⁶⁻¹⁷. Nguyen *et al* ont d'ailleurs appliqué la PLS à des mesures SERS afin de prédire la concentration de la toxine bactérienne pyocyanine dans des échantillons inconnus¹⁸⁻¹⁹. Aussi, la quantification simultanée d'isotope de C¹³-glucose et N¹⁴-ammonium en utilisant la PLS fut récemment démontrée par Chisanga *et al*²⁰. Pour faire ces prédictions, l'algorithme extrait les composantes principales (PC) par PCA. L'exactitude de ces prédictions dépend du nombre de PC utilisées par l'algorithme pour faire ses généralisations. Or, comme toute méthode d'apprentissage par machine, la PLS est donc sujette au surapprentissage si trop de PC sont utilisées pour le système étudié²¹ et nécessite donc une optimisation préalable²². Bien que les spectres SERS varie énormément lors de mesures en optophysologie, il serait possible de coupler la PLS à la sortie du réseau neuronal afin de faire la quantification de chaque analyte

préalablement classifié. Néanmoins, la PLS est une méthode de régression linéaire. Le signal SERS mesuré en optophysologie est converti en un nombre d'évènements moléculaires pour une période de temps τ afin d'approximer la concentration. Bien que le nombre d'évènements présente une certaine linéarité en fonction de la concentration, la relation entre le nombre d'évènements moléculaires et la concentration extracellulaire pourrait être mieux représentée par un modèle de régression non linéaire. L'utilisation de ANN ou de régression par machine à vecteurs de support (SVR) permettrait de tenir compte de cette non linéarité²³. Ce faisant, en couplant différent modèle de régression (ANN ou SVR) pour chaque sortie d'un réseau neuronal servant à la classification (Fig. 5.1), il serait possible d'effectuer une prédiction des concentrations de plusieurs analytes d'intérêt simultanément.

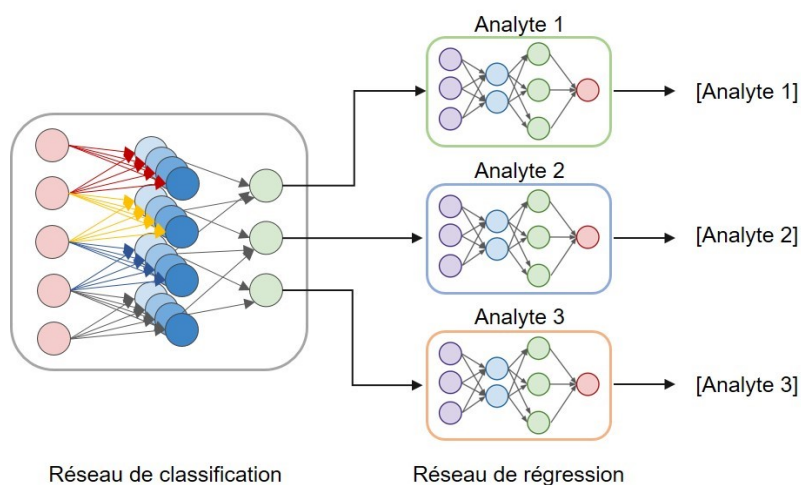


Figure 5.1 Présentation d'un réseau neuronal permettant la classification et la quantification. Les spectres SERS sont préalablement classé par un réseau neuronal, puis quantifié par régression non linéaire à l'aide de différents ANN, ou SVR, chacun entraîné pour la quantification d'un seul analyte.

Cependant, dans un cas où le spectre Raman change significativement dans le temps comme en optophysologie, l'utilisation de l'intensité d'une bande à des fins de quantification perd son sens. Bien que prometteuse, les méthodes de régression linéaire et non linéaire se basent essentiellement sur le ratio signal-sur-bruit (SNR) pour effectuer leurs prédictions. Peu d'approches jusqu'à présent furent développées afin de mesurer, de manière quantitative, une concentration d'analyte en utilisant une autre métrique que l'intensité absolue d'une bande.

Dans un exemple de succès, Brulé *et al.* ont démontré la quantification du bleu de méthylène (MB), dans un régime de molécule unique, en calculant la densité de probabilité (PDF) des photons Raman²⁴. Bien que cette approche permette une quantification sur plus de six ordres de grandeur et une LOD de 10^{-11} M, cette méthode ne s'applique actuellement qu'aux solutions pures, ne contenant qu'un seul analyte. Cette dernière serait donc plus difficilement implémentée aux mesures en optophysiology, généralement conduite en matrice complexe avec plusieurs analytes d'intérêts, que les méthodes de régressions.

5.2.2. Validation de l'optophysiology

5.2.2.1. Validation par spectrométrie de masse

La thèse présente les premiers développements de l'optophysiology, ainsi que divers exemples de son application dans l'analyse des sécrétions cellulaires. Afin que cette méthode soit acceptée par la communauté scientifique et qu'elle soit réellement utilisée dans divers domaines de recherches, il est essentiel que la méthode soit validée en la comparant à une autre méthode analytique robuste. La validation de la méthode est actuellement à l'étude. Pour y arriver, des expériences d'optophysiology SERS seront réalisées près de neurones originaires de différentes régions du cerveau de souris. Ces régions, correspondantes au mésencéphale, le cortex ainsi que le striatum, sont toutes composées de différents neurones libérant des neurotransmetteurs spécifiques. Le mésencéphale libère exclusivement DA en majorité, puis Glu et GABA ; le cortex libère majoritairement du Glu, puis GABA ; le striatum libère presque exclusivement du GABA, puis de ACh. Ces trois régions permettront de démontrer la capacité de l'optophysiology à différencier les neurones selon la composition des neurotransmetteurs libérés. Pour valider la méthode, des échantillons de l'environnement extracellulaire avant et après stimulation, seront localement prélevés à l'aide d'un capillaire et analysés par MS (Fig. 5.2). L'utilisation de la MS permettra de valider l'identité des neurotransmetteurs en plus de les quantifier. Ce faisant, il sera possible de confirmer la détection des neurotransmetteurs par SERS, puis évaluer si l'augmentation du nombre d'événements moléculaires est associée à une augmentation de la concentration réelle extracellulaire.

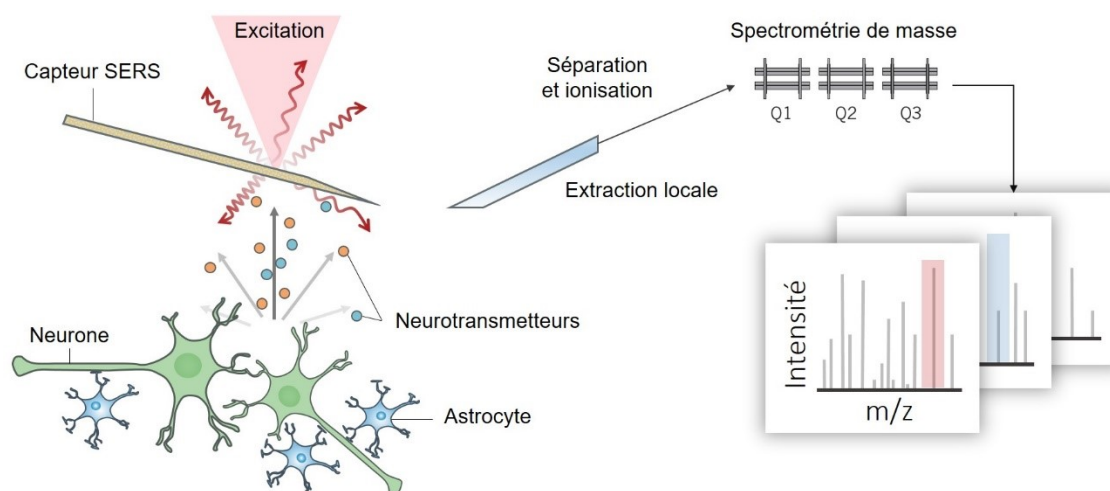


Figure 5.2 Validation de l’optophysiology SERS par analyse comparative avec la spectrométrie de masse (MS). Une expérience typique d’optophysiology sera effectuée près de neurones. Durant cette expérience, le milieu extracellulaire sera prélevé à l’aide d’un capillaire situé à la même distance des neurones que le capteur SERS. Le milieu extrait être par la suite séparée par chromatographie liquide (LC), ionisée par nébulisation électrostatique (ESI) puis analysée par triple quadripôle. Les divers neurotransmetteurs sont ensuite identifiés et quantifiés.

5.2.3. Couplage à l’optophysiology

Un axe de recherche intéressant serait d’évaluer les couplages potentiels de l’optophysiology a d’autres méthodes analytiques permettant des analyses *in situ*. Par exemple, puisque le capteur plasmonique est généré à la surface d’un capillaire de verre, il serait possible, en théorie, d’utiliser ce même capillaire pour effectuer une micro extraction locale pouvant être directement utilisé pour une analyse MS, ou encore par électrophorèse capillaire. Ce type de couplage permettrait de directement confirmer l’identité des molécules détectées par SERS. Cette information pourrait d’ailleurs servir à peaufiner les modèles d’intelligence artificielle, où actuellement, la détection d’une nouvelle molécule pour laquelle le modèle n’a pas été préalablement entraîné, est problématique.

Autrement, un couplage hautement prometteur serait de convertir le capillaire en une électrode nanométrique afin de permettre l'électrochimie-SERS (EC-SERS). Ce couplage apporterait plusieurs avantages : premièrement, il serait possible d'effectuer la co-détection *in situ* par SERS et par voie électrochimique de molécules électro-actives, et ce, avec une haute résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. Cette détection simultanée SERS-électrochimique servirait de preuve solide quant à la véracité des résultats associées à la détection par optophysologie. Deuxièmement, l'utilisation d'une électrode comme support permettrait de moduler le potentiel appliqué à l'électrode. Ce faisant, il est possible d'ajuster l'amplification en surface dans un état favorisant l'adsorption pour la molécule d'intérêt²⁵. De plus, il fut rapporté par Karaballi *et al* que l'application d'un potentiel augmente significativement la sensibilité en SERS en induisant la désorption de molécule adsorbée en surface comme le citrate²⁶. Des capteurs EC-SERS furent d'ailleurs appliqués pour la détection et l'identification de bactéries²⁷, pour la détection précoce de pré-éclampsies²⁸, ou encore pour la détection d'antibiotique²⁹. Ces exemples démontrent le potentiel des capteurs EC-SERS en tant qu'outils diagnostiques. Le couplage entre l'optophysologie et l'électrochimie permettrait sans aucun doute de dépasser les performances actuelles de la méthode.

5.2.4. Limitation des méthodes d'apprentissages supervisées

Le chapitre 4 présentait l'utilisation d'un CNN afin de classifier les différents spectres SERS acquis durant une mesure d'optophysologie près de cellules. Bien que hautement sélectif et sensible, les méthodes d'apprentissages supervisées, tels les réseaux neuronaux artificiels, effectuent leur classification strictement parmi les classes pour lesquels ils furent préalablement entraînés. Ainsi, si une nouvelle molécule pour laquelle le modèle n'a pas été préalablement entraîné est détectée par SERS, son spectre SERS sera associé exclusivement à l'une des classes du modèle. Cette caractéristique des conséquences majeures sur l'analyse des données : Le CNN ne permet pas de distinguer les molécules qui lui sont inconnues, nécessitant donc la création de classes pour toutes les molécules présentes dans l'environnement étudié. Puisque l'optophysologie a pour objectif primaire l'étude d'environnement cellulaire, composé d'un cocktail complexe de différentes molécules et protéines, la création d'une classe pour chaque

molécule est donc impensable. Ce problème fut abordé par Stöckel *et al* en introduisant n classeurs binaires, de type *One-against-the rest* (OATR), pour les n molécules³⁰⁻³². Lorsqu'un spectre SERS est présenté au modèle, il est comparé à chaque classer binaire. Si le spectre n'est associé à aucune ou à plus d'une des n molécules, le spectre sera associé à une classe *inconnue*. Cette ségrégation permet de minimiser le taux de faux positif associé à la présence de nouvelles molécules. De manière alternative, Kemmler *et al*, ainsi que Schmid *et al* ont tous deux démontrés la détection de nouvelles classes en incorporant des processus gaussiens (GP)³³⁻³⁵ dans leur méthode d'analyse multivariée.

La détection de nouvelles classes fut aussi introduite par le groupe de Yan LeCun pour la reconnaissance faciale³⁶, où le réseau identifiait les nouveaux visages pour lesquels il n'avait pas été préalablement entraîné. Cet exemple met en lumière les progrès rapides de l'intelligence artificielle au cours des dernières années. Le développement de nouvelles architectures de réseaux neuronaux, de nouvelles fonctions d'activation et d'optimisation offrant de meilleures performances ne serait tardées, dû à l'importante croissance des domaines de visions par ordinateur et de reconnaissance faciale. Ces nouveaux algorithmes pourront ensuite être appliqués au domaine de la spectroscopie et permettre le développement de modèle de classification plus performante. À l'aide de tel modèle, l'optophysologie SERS pourra ultimement analyser des environnements extracellulaires complexes avec des performances analytiques inégalées, permettre une compréhension approfondie de processus biologiques, du métabolisme cellulaire et des mécanismes de signalisation moléculaire entre des cellules vivantes. Le développement de l'optophysologie peut être perçu comme une pierre angulaire dans le domaine de la biodétection et que grâce à elle, plusieurs questions d'ordre biologique pourront être répondues.

5.3. Références

1. Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C., A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Phys Chem Chem Phys* **2008**, *10* (40), 6079-6089.
2. Zhu, H.; Lussier, F.; Ducrot, C.; Bourque, M. J.; Spatz, J. P.; Cui, W.; Yu, L.; Peng, W.; Trudeau, L. E.; Bazuin, C. G.; Masson, J. F., Block Copolymer Brush Layer-Templated Gold

Nanoparticles on Nanofibers for Surface-Enhanced Raman Scattering Optophysiology. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11* (4), 4373-4384.

3. Yockell-Lelièvre, H.; Lussier, F.; Masson, J. F., Influence of the Particle Shape and Density of Self-Assembled Gold Nanoparticle Sensors on LSPR and SERS. *J Phys Chem C* **2015**, *119* (51), 28577-28585.

4. Kumar, P. S.; Pastoriza-Santos, I.; Rodriguez-Gonzalez, B.; Garcia de Abajo, F. J.; Liz-Marzan, L. M., High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology* **2008**, *19* (1), 015606.

5. Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T., Gold Nanostars For Surface-Enhanced Raman Scattering: Synthesis, Characterization and Optimization. *J Phys Chem C* **2008**, *112* (48), 18849-18859.

6. Yuan, H.; Khoury, C. G.; Hwang, H.; Wilson, C. M.; Grant, G. A.; Vo-Dinh, T., Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology* **2012**, *23* (7), 075102.

7. Valencia, P. M.; Farokhzad, O. C.; Karnik, R.; Langer, R., Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 623-629.

8. Ma, J.; Lee, S. M.-Y.; Yi, C.; Li, C.-W., Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications – a review. *Lab Chip* **2017**, *17* (2), 209-226.

9. Marre, S.; Jensen, K. F., Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (3), 1183-1202.

10. Krishna, K. S.; Li, Y.; Li, S.; Kumar, C. S. S. R., Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (11), 1470-1495.

11. Abalde-Cela, S.; Taladriz-Blanco, P.; de Oliveira, M. G.; Abell, C., Droplet microfluidics for the highly controlled synthesis of branched gold nanoparticles. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 2440.

12. Mieszawska, A. J.; Slawinski, G. W.; Zamborini, F. P., Directing the Growth of Highly Aligned Gold Nanorods through a Surface Chemical Amidation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (17), 5622-5623.

13. Taub, N.; Krichevski, O.; Markovich, G., Growth of Gold Nanorods on Surfaces. *J Phys Chem B* **2003**, *107* (42), 11579-11582.

14. Wongkaew, N.; Simsek, M.; Griesche, C.; Baeumner, A. J., Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 120-194.
15. Goodacre, R., Explanatory analysis of spectroscopic data using machine learning of simple, interpretable rules. *Vib Spectrosc* **2003**, *32* (1), 33-45.
16. Ellis, D. I.; Broadhurst, D.; Kell, D. B.; Rowland, J. J.; Goodacre, R., Rapid and Quantitative Detection of the Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68* (6), 2822-2828.
17. Geladi, P.; Kowalski, B. R., Partial least-squares regression: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* **1986**, *185*, 1-17.
18. Nguyen, C.; Thrift, W.; Bhattacharjee, A.; Whiteson, K.; Hochbaum, A.; Ragan, R., *Robust SERS spectral analysis for quantitative detection of pyocyanin in biological fluids*. SPIE: 2017; Vol. 10352, p 8.
19. Nguyen, C. Q.; Thrift, W. J.; Bhattacharjee, A.; Ranjbar, S.; Gallagher, T.; Darvishzadeh-Varcheie, M.; Sanderson, R. N.; Capolino, F.; Whiteson, K.; Baldi, P.; Hochbaum, A. I.; Ragan, R., Longitudinal Monitoring of Biofilm Formation via Robust Surface-Enhanced Raman Scattering Quantification of *Pseudomonas aeruginosa*-Produced Metabolites. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10* (15), 12364-12373.
20. Chisanga, M.; Muhamadali, H.; Kimber, R.; Goodacre, R., Quantitative detection of isotopically enriched *E. coli* cells by SERS. *Faraday Discuss* **2017**, *205* (0), 331-343.
21. Gromski, P. S.; Muhamadali, H.; Ellis, D. I.; Xu, Y.; Correa, E.; Turner, M. L.; Goodacre, R., A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *879*, 10-23.
22. Deng, B.-C.; Yun, Y.-H.; Liang, Y.-Z.; Cao, D.-S.; Xu, Q.-S.; Yi, L.-Z.; Huang, X., A new strategy to prevent over-fitting in partial least squares models based on model population analysis. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *880*, 32-41.
23. Cheung, W.; Shadi, I. T.; Xu, Y.; Goodacre, R., Quantitative Analysis of the Banned Food Dye Sudan-1 Using Surface Enhanced Raman Scattering with Multivariate Chemometrics. *J Phys Chem C* **2010**, *114* (16), 7285-7290.

24. Brulé, T.; Bouhelier, A.; Yockell-Lelièvre, H.; Clément, J.-E.; Leray, A.; Dereux, A.; Finot, E., Statistical and Fourier Analysis for In-line Concentration Sensitivity in Single Molecule Dynamic-SERS. *ACS Photonics* **2015**, 2 (9), 1266-1271.
25. Wu, D.-Y.; Li, J.-F.; Ren, B.; Tian, Z.-Q., Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. *Chem Soc Rev* **2008**, 37 (5), 1025-1041.
26. Karaballi, R. A.; Nel, A.; Krishnan, S.; Blackburn, J.; Brosseau, C. L., Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) aptasensor for direct detection of DNA hybridization. *Phys Chem Chem Phys* **2015**, 17 (33), 21356-21363.
27. Lynk, T. P.; Sit, C. S.; Brosseau, C. L., Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Platform for Bacterial Detection and Identification. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (21), 12639-12646.
28. Goodall, B. L.; Robinson, A. M.; Brosseau, C. L., Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy (E-SERS) of uric acid: a potential rapid diagnostic method for early preeclampsia detection. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, 15 (5), 1382-1388.
29. Bindesri, S. D.; Alhatab, D. S.; Brosseau, C. L., Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) fabric-based plasmonic sensor for point-of-care diagnostics. *Analyst* **2018**, 143 (17), 4128-4135.
30. Stöckel, S.; Schumacher, W.; Meisel, S.; Elschner, M.; Rösch, P.; Popp, J., Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores. *Appl Environ Microbiol* **2010**, 76 (9), 2895-2907.
31. Tax, D. M. J.; Duin, R. P. W. In *Using two-class classifiers for multiclass classification*, Object recognition supported by user interaction for service robots, 11-15 Aug. 2002; 2002; pp 124-127 vol.2.
32. Schumacher, W.; Kühnert, M.; Rösch, P.; Popp, J., Identification and classification of organic and inorganic components of particulate matter via Raman spectroscopy and chemometric approaches. *J Raman Spectrosc* **2011**, 42 (3), 383-392.
33. Kemmler, M.; Rodner, E.; Wacker, E.-S.; Denzler, J., One-class classification with Gaussian processes. *Pattern Recognit.* **2013**, 46 (12), 3507-3518.
34. Kemmler, M.; Rodner, E.; Rösch, P.; Popp, J.; Denzler, J., Automatic identification of novel bacteria using Raman spectroscopy and Gaussian processes. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 794, 29-37.

35. Schmid, U.; Rösch, P.; Krause, M.; Harz, M.; Popp, J.; Baumann, K., Gaussian mixture discriminant analysis for the single-cell differentiation of bacteria using micro-Raman spectroscopy. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2009**, 96 (2), 159-171.
36. Chopra, S.; Hadsell, R.; LeCun, Y. In *Learning a similarity metric discriminatively, with application to face verification*, 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05), 20-25 June 2005; 2005; pp 539-546 vol. 1.

